面向21世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

细胞生物学

翟中和 王喜忠 丁明孝 主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

面 向 2 1 世 纪 课 程 教 材
Textbook Series for 21st Century

细胞生物学

翟中和　王喜忠　丁明孝　主编

高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

内容提要

本书是教育部"高等教育面向21世纪教学内容和课程体系改革计划"项目研究成果。由中国科学院院士、北京大学翟中和教授，四川大学王喜忠教授，北京大学丁明孝教授主编。是教育部推荐的"面向21世纪课程教材"，同时也是"九五"国家级重点教材。

本书保持了翟中和主编、1995年出版的《细胞生物学》简明、实用、内容新的优点，在内容上、体系上均有很大创新。以细胞的超微结构及功能为主线，以细胞的分子生物学为视点，并加重了细胞重大生命活动的内容，既系统地阐述了细胞生物学的基本概念、基础理论和基本技能，又反映了学科前沿，把经典内容和前沿知识有机地结合在一起。

本书可供综合大学、农学院校、林学院校、医学院校的本科生、研究生使用，也可供教师与有关科研工作人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学/翟中和，王喜忠，丁明孝主编．—北京：高等教育出版社，2000(2001重印)

ISBN 7-04-008614-X

Ⅰ．细… Ⅱ．①翟… ②王… ③丁… Ⅲ．细胞学：生物学-高等学校-教材 Ⅳ．Q27

中国版本图书馆CIP数据核字(2000)第26397号

细胞生物学

翟中和　王喜忠　丁明孝　主编

出版发行	高等教育出版社		
社　址	北京市东城区沙滩后街55号	邮政编码	100009
电　话	010-64054588	传　真	010-64014048
网　址	http://www.hep.edu.cn		
经　销	新华书店北京发行所		
印　刷	北京民族印刷厂		
开　本	850×1168　1/16	版　次	2000年8月第1版
印　张	31.75	印　次	2001年5月第2次印刷
字　数	660 000	定　价	33.40元

面向21世纪课程教材

普通高等教育“九五”
国家级重点教材

《细胞生物学》编写人员

翟中和　王喜忠　丁明孝　主编

丁明孝　王喜忠　张　博
张传茂　周青山　翟中和　编著
蔡树涛　戴尧仁
（按姓氏笔画排序）

编者的话

经过长达三年的努力，《细胞生物学》一书终于完稿付印。在欣慰之余，编写组全体成员仍怀着惶恐的心情等待此书与读者见面。我们编写组部分成员曾参加编写过1995年由高等教育出版社出版的《细胞生物学》教材，该书出版后承蒙许多专家与读者的喜爱并给予鼓励和指教，我们深表感谢，但也很快意识到了它的不足。细胞生物学知识结构更新很快，教学内容往往跟不上形势发展的要求。1998年，结合“高等教育面向21世纪教学内容和课程体系改革计划”课题研究，编写这本新的《细胞生物学》并被教育部和高等教育出版社列入“面向21世纪课程教材”出版规划，希望能与国内已有的细胞生物学教材起到互补与共勉的作用，以适应教学发展的要求。

细胞生物学是迅猛发展的生命科学的重要基础学科，有关细胞的基础知识和相关研究是现代生命科学发展的重要支柱之一。在它的内容中处处体现着与现代生物学各分支学科的交叉与整合。我们清醒地认识到，以我们之中任何个人的知识、经验与能力都不可能在较短期间内独立完成这样一本现代细胞生物学教材的撰写任务。因此，本书是集体创作的成果。参加撰稿的既有在细胞生物学教学与科研方面工作数十年的教师，也有正在该学科前沿领域从事科研的青年学者。

鉴于本书是生物学科本科生专业基础课教材，同时也考虑到又能作为研究生、教师与科研人员及其他学科(诸如农学与医学等)工作人员的参考书，因此，在着重考虑教材所要求的基础性与系统性的同时，还较多地考虑到其内容的先进性与知识结构的合理性。编写人员在多年教学实践经验的基础上，根据近年来细胞生物学研究的进展和人才培养的需求，对本教材的结构体系和教学内容做了较认真的思考与探讨，并作了某些改革尝试，是否得当尚需经过进一步的教学实践的检验。此外，为了适应我国目前的出版印刷水平，我们自行设计或修改了一些模式图，力求简明；有些插图尽量应用国内学者的科研成果，请读者予以理解。清华大学生物科学与技术系戴尧仁教授，青年学者张传茂博士、蔡树涛博士与张博博士，在国内外从事繁重科学研究的同时，拨冗为本书撰写有关章节，吸收国际先进科学知识融合于本教材，这是很可贵的。

王永潮教授、何大澄教授、陈建国教授、樊启昶教授、徐伟教授等同仁对本书某些章节进行了审阅，并提出了中肯的意见，我们在此表示衷心感谢。

周青山教授在撰写本书有关章节的同时，付出巨大的精力，对本书进行全面的校阅并做了全部名词的索引与校对；刘春香老师负责书稿的打印与编排，并协助做了许多具体事务工作；李丽霞老师参加本书不少图版的绘制、注释和名词索引的整理；卢智刚同学协助做了很多技术校正与图稿的计算机处理。上述同志的辛勤劳动，对本书的顺利完成起了重要作用。梁凤霞博士、焦仁杰博士、曲健博士、赵允与刘晓玲等为本书提供了图片与资料；此外本书责任编辑孙素青同志与本书编写组密切配合，在编写过程中提出许多

有益的指导性意见，在此我们一并表示深深的感谢。

编写组全体成员在完成此书时并没有一点轻松的感觉。细胞生物学是一门发展迅速的学科，知识结构在不断地拓宽，许多概念与内容不断地更新，编者深感自己知识与能力有限，直至交稿仍感本书在很多方面尚有不足与欠缺，甚至难免有错漏之处，敬请专家和读者指正。

主编于2000年1月

责任编辑　孙素青　田　军
封面设计　张　楠
责任绘图　朱　静
版式设计　马静如
责任校对　陈　荣
责任印制　陈伟光

目 录

第一章 绪 论

第二章 细胞基本知识概要

第三章 细胞生物学研究方法

第四章 细胞膜与细胞表面

第五章　物质的跨膜运输与信号传递

第六章　细胞质基质与细胞内膜系统

第七章 细胞的能量转换——线粒体和叶绿体

第八章　细胞核与染色体

第九章　核　糖　体

第十章　细胞骨架

第十一章　细胞增殖及其调控

第十二章　细胞分化与基因表达调控

第十三章　细胞衰老与凋亡

第一章

绪　论

第一节　细胞生物学研究的内容与现状

一、细胞生物学是现代生命科学的重要基础学科

细胞生物学(cell biology)是研究细胞基本生命活动规律的科学，它在不同层次(显微、亚显微与分子水平)上以研究细胞结构与功能，细胞增殖、分化、衰老与凋亡，细胞信号传递，真核细胞基因表达与调控，细胞起源与进化等为主要内容。细胞分子生物学是当今细胞生物学的重点，细胞工程可能是21世纪生物工程发展的重要组成部分。可以预见，细胞的结构与基本生命活动的研究将越来越深入，并将成为21世纪初生命科学研究的重要领域之一。

生命体是多层次、非线性、多侧面的复杂结构体系，而细胞是生命体的结构与生命活动的基本单位，有了细胞才有完整的生命活动。一切生命现象的奥秘都要从细胞中寻求答案。细胞的研究是生命科学的基础，也是现代生命科学发展的重要支柱。早在1925年，生物学大师Wilson就提出："一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找。"重温这句名言，至今仍感内涵很深。

生物的生殖发育、遗传、神经(脑)活动等重大生命现象的研究都要以细胞为基础。植物与动物生长发育是依靠细胞增殖、细胞分化与细胞凋亡来实现的。人大脑的活动是靠10^{12}个细胞及其相互协调而进行的。一切疾病的发病机制也要以细胞病变研究为基础。以基因工程为主的现代生物技术主要是通过对细胞操作为基础而进行的。因此，细胞生物学与农业、医学、生物高技术发展有着密不可分的关系，它将在解决人类面临的重大问题，促进经济和社会发展中发挥重要的基础作用。

我国高等学校在生物科学的教学中，将细胞生物学定为基础课程，是符合现代生物学科发展规律的。在我国基础科学发展规划中，把细胞生物学、分子生物学、神经生物学和生态学并列为生命科学的四大基础学科，反映了现代生命科学

的发展趋势。

由于分子生物学概念、方法与技术的引入，细胞生物学在近十年取得了突破性的进展，产生了许多新的生长点，并逐渐形成新的概念与新的领域。很多科学家认为，在21世纪，细胞生物学将继续迅猛发展，因为它是揭示生命奥秘不可缺少的"主角"。细胞自身又是多层次的复杂结构体系，它是物质(结构)、信息与能量相互"辉映"的综合体。它的很多基本生命活动过程是如何有序而被自动调控的还不是很清楚，生物大分子如何逐级有序地组装成行使生命活动的细胞基本结构体系也相当朦胧。假如不重视细胞的基础研究，势必影响21世纪生命科学的整体发展速度。为此，我国应十分重视这一领域的基础研究。

可以概括地说，细胞生物学是应用现代物理学与化学的技术成就和分子生物学的概念与方法，以细胞作为生命活动的基本单位的思想为出发点，探索生命活动规律的学科，其核心问题是将遗传与发育在细胞水平上结合起来。还应指出，细胞生物学是一门正在迅速发展中的新兴学科，与其他生物学科相比较，还不具备完整的学科体系，其研究内容与范畴往往与生命科学的其他学科交错在一起，甚至目前很难为细胞生物学划出一个明确的范围。

二、细胞生物学的主要研究内容

细胞生物学研究与教学内容一般可分为细胞结构功能与细胞重要生命活动两大基本部分，但它们又不能截然分开的。从20世纪60年代开始，由于细胞超微结构研究积累的大量资料大大充实与拓宽了细胞结构与功能的知识范畴。在细胞生物学教科书中，细胞结构和功能知识内容所占比例较多。从70年代中期开始，由于分子生物学概念、内容与方法的引入，使细胞生物学面貌发生了深刻的变化，不仅使细胞结构和功能的研究更深入，对细胞重大生命活动规律及其调控机制的研究也取得了巨大发展，极大地丰富与改变了细胞的知识结构。因此，现代细胞生物学教科书中细胞重要生命活动的知识所占比重越来越大。

当前细胞生物学研究内容大致归纳为以下诸多领域：

(一) 细胞核、染色体以及基因表达的研究

细胞核是遗传物质DNA贮存的场所，也是遗传信息转录为mRNA、rRNA与tRNA的场所。染色质与染色体是遗传物质的载体，核仁是转录rRNA与装配核糖体亚单位的具体场所。核膜与核孔复合体是核质之间物质交换与信息交流的结构。细胞核与染色体的研究历来是经典细胞学的重点，也是细胞遗传学的核心部分。而现代细胞生物学的核心课题之一就是研究染色体结构动态变化与基因表达及其调控的关系，它是目前细胞生物学、遗传学与发育生物学在细胞水平与分子水平上相结合的最活跃的热门课题。

(二) 生物膜与细胞器的研究

生物膜是细胞结构的重要基础，大部分细胞器(包括核膜)都是以生物膜为基础构建的。生物膜的主要功能是进行细胞内外物质与信息的交换，也具有对

细胞内外因子识别的功能。生物膜的研究又是研究细胞器结构与功能的基础。近十多年来,生物膜研究的主要内容是膜的结构模型与物质的跨膜运输机制。磷脂双分子层与膜蛋白的相互关系是研究生物膜结构与功能的重要内容。几年来,在膜的识别与受体效应、蛋白质分子跨膜运输与定向分选等方面取得了巨大进展。

细胞器的研究历来是认识细胞结构与功能的重要组成部分。产能细胞器——线粒体和叶绿体结构与换能机制的研究已很深入,线粒体 DNA 与叶绿体 DNA 的发现及其半自主性的研究使人们对这两种细胞器又有了新的认识。近年对内质网、高尔基体与溶酶体功能的研究也增添了许多新的知识。核糖体 RNA 能催化肽链的合成的发现,大大加深了人们对核糖体功能的认识,同时也显示了它在生命起源与进化中的重要地位。

(三)细胞骨架体系的研究

细胞骨架体系的研究在细胞生物学中是一个比较新的、发展中的研究领域。广义的细胞骨架概念应该包括细胞质骨架与核骨架两大部分。

细胞骨架体系的研究越来越受到重视,因为细胞骨架在维持细胞形态与保持细胞内部结构的合理布局中起主要作用。近来还发现细胞骨架与一系列重要生命活动,诸如细胞内大分子的运输与细胞器的运动、细胞信息的传递、基因表达与大分子加工等均有密切关系。近年细胞核骨架的研究是进展很快的领域之一。核骨架包括核基质、核纤层和核孔复合体,不仅参与核染色体的构建,而且与基因表达关系密切。

(四)细胞增殖及其调控

一切动植物的生长与发育都是通过细胞的增殖与分化来实现的。研究细胞增殖的基本规律及其调控机制不仅是控制生物生长与发育的基础,而且是研究癌变发生及逆转的重要途径。目前国际上研究细胞增殖的调控主要从两方面进行:一是从环境中与有机体中寻找控制细胞增殖的因子,以及阐明它们的作用机制。各种生长因子的发现及其作用机制的揭示是近年在这一领域中重要的进展。二是寻找控制细胞增殖的关键性基因,并通过调节基因产物来控制细胞的增殖。细胞的癌基因与抑癌基因及其表达产物均与细胞增殖有关。

(五)细胞分化及其调控

细胞分化是生物发育的基础。近年,细胞分化的研究已越来越显示出其重要性,也是细胞生物学、发育生物学与遗传学的重要会合点。近代生物科学的发展,尤其是分子生物学技术的建立已为细胞分化机制的研究奠定了良好的基础,也是近年发育生物学蓬勃发展的重要原因。

一个受精卵通过分裂与分化如何发育为复杂的有机体,是生命科学中引人入胜的主课题之一。细胞"全能性"的揭示,使人们认识到可以控制细胞的分化,而且可能将已分化的细胞进行"去分化",并使其分裂与再分化,这为控制生物的生长发育展示了诱人的前景。多数细胞生物学家认为肿瘤是不分化与去分化的结果,人们在考虑通过启动分化基因的表达来抑制癌基因的表达。

目前认为细胞分化的本质是细胞内基因选择性表达特异功能蛋白质的过程。近年,细胞分化及其调控机制的研究,主要集中在编码特异蛋白质基因的选择性表达规律及其调控方面。

(六) 细胞的衰老与凋亡

细胞衰老的研究是研究人与动植物寿命的基础。细胞总体的衰老导致个体的衰老,但细胞的衰老与有机体的衰老又是不同的概念。不少科学家认为细胞衰老的研究将成为21世纪初的热门课题之一。

目前多数科学家是用细胞体外培养的方法来研究细胞衰老的规律。大量实验说明,动物二倍体细胞在体外分裂与传代的次数是有限的,从而可推测体内细胞的寿命受分裂次数的限制,细胞的衰老是必然规律。人们总是希望通过细胞衰老因素与因子的研究延长细胞的寿命。近年人们力图寻找细胞中的"衰老基因"及其信号转导等。

细胞凋亡是近年生命科学中发展起来的重要的新兴领域之一。细胞凋亡是由一系列基因控制并受复杂信号调节的细胞自然死亡现象。细胞凋亡可能是生物正常生理发育与病理过程中的重要平衡因素。

(七) 细胞的起源与进化

细胞起源与进化的研究是重要的理论问题,也是难度很大的研究课题,我们应该十分尊重先驱科学家在这一领域所取得的成果。

根据古微生物的证据,原始细胞大约在35亿多年前就在地球上出现。生命的物质只有当其以细胞形式出现时才能稳定地在地球上存在下去,但是这个进程已成为历史,在现在实验室条件下模拟30多亿年前的地球环境,研究细胞的起源过程几乎是不大可能的。目前有关细胞起源学说在很大程度上是推理性的,还需要补充更多的事实细节。

真核细胞的起源与进化研究已取得了较多的成果,近年由于分子生物学方法引入生物进化的研究,为细胞进化与细胞器进化的研究增添了很多新的内容。

(八) 细胞工程

细胞工程是细胞生物学与遗传学的交叉领域,这种改造细胞的技术是生物工程技术的重要组成部分。它不仅对工农业生产和医药实践有重要意义,而且也是认识细胞生命活动规律的一种重要途径与手段。

细胞工程能用人工方法使不同种细胞的基因或基因组重组到杂交细胞中,或者使基因与基因组由一种细胞转移到另一种细胞中,并使越过种的障碍的基因转移成为可能,由此人们开始探索人工创造新的遗传型细胞的尝试。动植物体细胞的杂交试验一直是细胞工程中最活跃的领域。通过动物体细胞杂交而获得单克隆抗体技术的建立,是细胞工程中最富成果性的工作范例。近年在世界范围兴起的用哺乳动物体细胞克隆而获得无性繁殖胚胎与个体,是细胞工程最具创新的进展之一。

目前人们对细胞工程范畴的理解可能较上述范围更宽更广。

还应该说明,当前细胞生物学研究的范畴远不止上述的内容,细胞信号转导

已成为细胞生物学中最热门的领域之一。近年来一切重大生命活动的研究都离不开细胞信号转导的内容与手段。此外,如细胞外基质、细胞社会学与细胞免疫学等研究,近年也有较快的发展。

三、当前细胞生物学研究的总趋势与重点领域

细胞生物学与分子生物学相互渗透与交融是总的发展趋势。无论是对细胞结构与功能的深入研究,还是对细胞重大生命活动规律的探索,都需要用分子生物学的新概念与新方法,在分子水平上进行研究,换句话说,细胞分子生物学或分子细胞生物学将是今后相当一段时间的主流。

(一)当前细胞生物学研究中的三大基本问题

当前细胞生物学研究的课题归纳起来是研究三个根本性的问题:

1. 细胞内的基因组(人类大约有 10 万个基因)是如何在时间与空间上有序表达的?假如我们将一些基因放在试管内,只要条件都能满足,它们都可以完成表达。但在细胞内环境中,它们能否表达及其表达程序都将受到严格的调节与控制。这就是细胞作为结构与生命活动的基本单位的奥妙所在。细胞结构与生命活动的有序性是十分复杂的,是非线性调控过程。这种调控网络可能是迄今任何一台计算机无法比拟的。

2. 基因表达的产物——主要是结构蛋白与核酸、脂质、多糖及其复合物,它们如何逐级装配成能行使生命活动的基本结构体系及各种细胞器?这种自组装过程的调控程序与调控机制是什么?这又是 21 世纪极富挑战性的领域。我们认为它应是新兴的结构生物学的重要组成部分,生命活动很多本质问题能在这里找到答案。

3. 基因表达的产物——主要是大量活性因子与信号分子,它们是如何调节细胞最重要的生命活动过程的?诸如细胞的增殖、分化、衰老与凋亡等等。这些方面的研究现在正方兴未艾。

(二)当前细胞基本生命活动研究的若干重大课题

1. 染色体 DNA 与蛋白质相互作用关系——主要是非组蛋白对基因组的作用

近年来染色体(质)的概念有很大的改变。可以认为染色体是由一条巨大的 DNA 分子与其结合蛋白形成的动态复合结构,可分为细胞间期染色体与分裂期染色体。两者在细胞周期中的交替与互相转换,主要是由 DNA 与蛋白动态结合关系所决定的。DNA 是遗传密码的分子结构,蛋白质是调节 DNA 复制与转录活性并参与染色体构建的元件。染色体 DNA 结合蛋白可分为组蛋白与非组蛋白。核小体的发现及其结构的阐明,对 5 种组蛋白的作用已基本清楚。大量与种类繁多的非组蛋白(NHP)与 DNA 的相互关系是研究的主要问题,特别是它们对 DNA 的复制、基因组有序表达与染色体高层次构建及动态结构变化的作用是核心问题。

2．细胞增殖、分化、凋亡(编程性死亡)的相互关系及其调控

细胞增殖、分化、凋亡与衰老是细胞最重要的生命活动现象，它们既相互联系又相互制约并受到一系列基因的调控。一切动植物生长发育都是依靠细胞增殖、分化与凋亡来实现的。细胞癌变是由于细胞增殖、分化或凋亡与衰老失控所致。受精卵如何有条不紊地发育为复杂的成体，一直是人们企图揭开的奥秘。由于近年遗传与发育在分子水平上统一所取得的巨大进展，为揭示这一问题提供了光明前景。而细胞分化及其调控机制的研究，将是解决这一重大问题的基础。

细胞凋亡的研究是近年生命科学中发展起来的热点课题。细胞凋亡是受外环境多种信号刺激，由基因调控的"主动自然"死亡，在细胞增殖、分化及多种病理过程中具有重要互补作用。细胞凋亡可能是发育进程的重要平衡因素。例如：哺乳动物脑的发育过程中有20%～50%的脑神经细胞发生凋亡；泌乳细胞在婴儿断乳后很快凋亡，代之以脂肪细胞。应该凋亡的细胞不凋亡也是致癌的重要因素。

人们正在寻找通过促进细胞凋亡的研究为治疗癌症提供依据及手段。植物细胞与单细胞生物有无类似动物细胞的凋亡现象正是我们要探索的问题。不论是细胞增殖与分化，还是细胞凋亡的研究，当前的核心问题是应抓住其调控机制的研究。

3．细胞信号转导的研究

细胞信号转导的研究与生命科学中的许多重要问题密切相关，它已成为了解错综复杂的生命现象不可缺少的内容并成为生命科学多领域、多层次的纽带。细胞信号转导的研究对了解生命本质与细胞基本生命活动有重要理论意义。

当前细胞信号传递的基本内容是：① 细胞间信号传递：重点是信号分子的结构与功能、信号分子与受体相互作用机制；② 受体与信号跨膜转导：G蛋白的发现与较深人的研究使受体转换器的概念与结构功能更具体化；③ 细胞内信号传递途径：蛋白磷酸化与去磷酸化可能是信号转导的关键，直至使转录因子磷酸化，从而调节基因的转录。把信号转导与基因表达调控联系起来的研究可能是最吸引人的课题之一。

应该指出，细胞信号转导是通过复杂的网络系统而实现的，呈现高度的非线性、多侧面的特点。信号转导通路可能不是单一的或简单的叠加。因此，研究细胞信号传递通路的相互作用将成为该课题的热点。

4．细胞结构体系的装配

生物大分子如何逐级装配并最终形成生物赖以进行生命活动的细胞结构体系？这是当前生命科学面临的最基本的问题之一。这一课题不仅是揭示细胞生命本质与奥妙的重要组成部分，而且也是研究细胞结构与功能在方法学上的新思考。大分子能逐级自装配成能行使生命功能的基本细胞体系，本身就是引人入胜的重大问题。

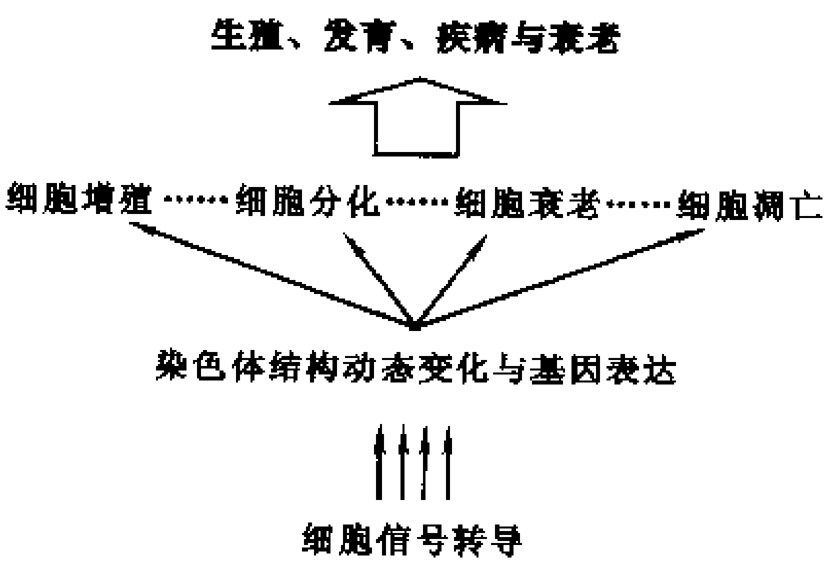
在分子水平上研究与解释生命的现象与本质固然十分重要，但细胞结构体系的自装配与去装配动态过程不能简单归属于分子水平的活动，尚需在更高结

构层次上进行细致的工作。生命活动的基础是细胞内高度有序的动态的复合结构体系。在亚细胞水平我们可以将细胞结构大致归纳为三大基本结构体系：由蛋白与核酸构建的遗传信息结构体系（包括染色体、核仁、核糖体）；由蛋白与脂质构建的膜的结构体系（包括细胞膜、核膜与各种细胞器膜）；由蛋白与蛋白构成的细胞骨架结构体系。由这些基本结构体系形成的细胞器与各级结构在细胞内进行装配、去装配、重装配与重建（改建）等过程。有不少细胞结构可以在体外进行装配与重装配。体外装配实验模式的建立，对研究细胞结构体系装配机制提供了很好的基础与手段。近年来在这一领域进展最快的是细胞核体外装配（重建）、细胞骨架装配、人工染色体与人工膜装配等的研究。

最后必须指出，上述诸领域与课题还不能概括细胞基本生命活动的所有重大问题。还有很多方面，诸如蛋白质合成、分选与跨膜定向运输，真核细胞起源与进化等等，不仅对细胞基本生命活动规律的认识很重要，而且近年也有迅速的进展。

根据美国科学情报研究所（ISI）1997 年 SCI（Science Citation Index）收录及引用论文检索说明，全世界自然科学研究中论文发表最集中的三个领域分别是：细胞信号转导（signal transduction）、细胞凋亡（cell apoptosis）和基因组与后基因组学研究（genome and post-genomic analysis）。美国国立卫生研究院（NIH）在 1988 年底发表的一份题为《什么是当今科研领域的热门话题?》（"What is popular in research today?"）的调查报告中指出，目前全球研究最热门的是三种疾病：癌症（cancer）、心血管病（cardiovascular diseases）、艾滋病和肝炎等传染病（infectious diseases：AIDS，hepatitis）和 5 大研究方向：① 细胞周期调控（cell cycle control）；② 细胞凋亡（cell apoptosis）；③ 细胞衰老（cell senescence）；④ 信号转导（signal transduction）；⑤ DNA 的损伤与修复（DNA damage and repair）。

由于细胞是生命活动的基本单位，又是生命的缩影，它不仅体现了生命的多样性和统一性，更体现了生命的复杂性。显然，我们对细胞重大生命活动的认识，必须建立在创新思维的基础上，着力探索它们彼此之间的关系，以及这些重大生命活动与求解人类所面临的诸多问题之间的关系。为此，我们给出如下一个有关的重大问题的图式，激励众多生物学工作者及学生去思考和研究。



细胞重大生命活动

第二节 细胞学与细胞生物学发展简史

现在许多科学家认为,可以把生物科学的发展划分为三个阶段:① 19 世纪以及更前的时期,是以形态描述为主的生物科学时期;② 20 世纪的前半个世纪,主要是实验生物学时期;③ 20 世纪 50~60 年代以来,由于 DNA 双螺旋的发现与中心法则的建立,开始进入了精细定性与定量的生物学时期。细胞学的发展史和细胞生物学学科的建立与发展,大致是符合这一历史进程的。

现代细胞生物学已发展到很高的水平,已非经典细胞学可以比拟,但遵循科学发展的规律,我们仍有必要简要重温一下细胞学与细胞生物学发展的历史,有助于我们加深对细胞生物学学科的形成及其历史条件的认识。

细胞学与细胞生物学发展的历史大致可划分为以下几个阶段:

一、细胞的发现

英国学者胡克(Robert Hooke)于 1665 年用自制的显微镜(放大倍数为 40~140 倍),观察了软木(栎树皮)的薄片,第一次描述了植物细胞的构造,并首次借用拉丁文 cellar(小室)这个词,来称呼他所看到的类似蜂巢的极小的封闭状小室(实际上只是观察到纤维质的细胞壁)。后来英文用 cell 这个词,中文翻译成"细胞"是很合适的。胡克有关细胞的首次描述,出现在他 1665 年发表的著作《显微图谱》一书中。因此,人们也就认为细胞的发现是在 1665 年。

此后不久,荷兰学者列文虎克(A.V.Leeuwen Hoek)用设计较好的显微镜,观察了许多动植物的活细胞与原生动物,并于 1674 年在观察鱼的红细胞时描述了细胞核的结构。大约与此同时,意大利的 Malpighi 与英国的 Grew 注意到了植物细胞中细胞壁与细胞质的区别。此后对细胞观察的资料虽然不断增加,积累了较丰富的材料,然而在长达 170 多年的历史中,对细胞的知识以及它与有机体的关系,人们并没有进行科学的概括,也没有上升到具有普遍指导意义的理论高度。

二、细胞学说的建立及其意义

1838 年,德国植物学家施莱登(M. J. Schleiden)发表了《植物发生论》,指出细胞是构成植物的基本单位。1839 年,德国动物学家施旺(M.J.Schwann)发表了他的《关于动植物的结构和生长的一致性的显微研究》论文,指出动植物都是细胞的集合物。施旺和施莱登两人共同提出:一切植物、动物都是由细胞组成的,细胞是一切动植物的基本单位,这就是著名的"细胞学说"(cell theory)。细胞学说是最初的一般生物学概括之一。使细胞及其功能有了一个较为明确的定义,宣告了著名的"细胞学说"基本原则的建立。对现代生物学的发展具有重要

的意义。恩格斯把细胞学说、能量转化与守恒定律和达尔文进化论并列为19世纪自然科学的"三大发现",因为它大大推进了人类对整个自然界的认识,有力地促进了自然科学和哲学的进步。

当时"细胞学说"的基本内容是:① 认为细胞是有机体,一切动植物都是由细胞发育而来,并由细胞和细胞产物所构成;② 每个细胞作为一个相对独立的单位,既有它"自己的"生命,又对与其他细胞共同组成的整体的生命有所助益;③ 新的细胞可以通过老的细胞繁殖产生。除此以外,施莱登还认识到了细胞核作用的重要性。施旺曾经指出:细胞现象有两类,一类是"造型现象",另一类是"生理现象",并首次称后者为"代谢过程"。这说明他已经正确地估计到细胞不仅是构成单位,而且是功能单位。施旺还提出了机体的各类组织(骨骼、血液、肌肉等)之间以细胞类型及其相互关系为基础的区分。

"细胞学说"提出后的十几年中,即迅速被推广到许多领域的研究,对当时生物学的发展起了巨大的促进和指导作用。这一学说本身也迅速得到充实、发展而日臻完善。如 Sichold 等通过对原生动物的研究证明,不仅动植物,而且原生动物也是由细胞组成的,它是只含一个细胞的动物,它能独立地进行全部生命活动。Albert Kolliker 通过对胚胎学的研究,证明了生物个体发育的过程就是细胞不断繁殖和分化的连续过程。施莱登和施旺在不少细节上的谬误则被纠正。如施莱登曾认为,细胞的繁殖是新细胞在老细胞的核中产生,通过细胞崩解而完成的。这种看法到1840年即被一系列学者的研究所修正,认识到细胞的繁殖是通过某种形式的"分裂"而完成的,尤其是德国医生和病理学家魏尔肖(Virchow)1858年指出,"细胞只能来自细胞",正如"动物只能来自动物,植物只能来自植物"一样。此外,他还提出机体的一切病理表现都是基于细胞的损伤。魏尔肖关于细胞来自细胞的观点,进一步指明了细胞作为一个相对独立的生命活动基本单位的性质,通常被承认是对细胞学说的一个重要补充。因此,有些人建议细胞学说应当算是在1858年才最后完成的。

细胞学说的提出对生物科学的发展具有重大的意义。恩格斯说:"有了这个发现,有机的有生命的自然产物的研究——比较解剖学、生理学和胚胎学——才获得了巩固的基础"。人们通常称1838—1839年施旺和施莱登确立的细胞学说,1859年达尔文确立的进化论和1866年孟德尔确立的遗传学为现代生物学的三大基石,而实际上,可以说细胞学说又是后两者的"基石"。对细胞结构的了解是其他一切生物科学和医学分支进一步发展所不可缺少的。

三、细胞学的经典时期

细胞学说建立后,很自然地掀起了对多种细胞进行广泛的观察与描述的高潮,各主要的细胞器和细胞分裂活动被发现,构成了细胞学的经典时期,主要是指19世纪的最后25年。

1. 原生质理论的提出

1840 年普金耶(Pukinje)和 1846 年冯·莫尔(Von Mohl)首次将动物、植物细胞的内含物称为“原生质”(protoplasm)。1861 年舒尔策(Max Schultze)提出了原生质理论,认为有机体的组织单位是一小团原生质,这种物质在一般有机体中是相似的。1880 年 Hanstein 提出“原生质体”(protoplast)的概念,因此细胞的最后概念就变成由细胞膜包围的一团原生质,分化为细胞核与细胞质。这一名词显然比 cell(细胞,小室)更确切了。但由于 cell 一词已经通行,所以就沿用下来。然而,这一重要的基本概念的深化,使人们对细胞的研究展现出新的面貌。

2. 细胞分裂的研究

1841 年 Remak 发现鸡胚血细胞的直接分裂,其后 Flemming 在动物细胞中,Strasburger 在植物细胞中发现有丝分裂(mitosis),并证实有丝分裂的实质是核内丝状物(染色体)的形成及其向两个子细胞的平均分配。Van Beneden(1883 年)和 Strasburger(1886 年)分别在动物与植物细胞中发现减数分裂,至此发现了细胞分裂的主要类型。

3. 重要细胞器的发现

此后,大家的注意力又转向了细胞质。这一时期,随着显微镜原理和装置的重大发展,显微镜的分辨能力大为提高,并发明了石蜡切片方法和若干重要的染色方法,继而各种细胞器相继被发现。如 1883 年 Van Beneden 和 Boveri 发现中心体,1894 年 Altmann 发现线粒体,Golgi 发现了高尔基体。

由于上述的发现,人们对细胞的基本认识大为丰富起来。这一时期的研究方法,主要是显微镜下形态的描述。

四、实验细胞学与细胞学的分支及其发展

1876 年 O.Hertwig 发现受精后两个细胞核合并的现象。1892 年在《细胞和组织》一书中,他提出生物学的基础在于研究细胞的特性、结构和机能,以细胞为基础,对所有生物学现象作一般性综合,从而使细胞学成为生物科学的一个独立分支。同时,由于他采用实验方法研究海胆和蛔虫卵发育中的核质关系,实际上创立了实验细胞学。此后,人们广泛应用实验的手段与分析的方法来研究细胞学中的一些根本问题,为细胞学的研究开辟了一些新的方向与领域,并与其他生物科学结合形成一些重要的分支。特别是在后期,由于体外培养技术的应用使实验细胞学得到迅速的发展。

(一) 细胞遗传学的发展

1876 年 O.Hertwig 发现了动物的受精现象。1883 年 Van Beneden 发现了蛔虫的卵和精子的染色体只有体细胞的一半。1888 年 Strasburger、1893 年 Overton 等在植物体也发现受精现象,并证明生殖细胞的染色体也比体细胞少一半。1900 年,孟德尔在 34 年前发表的遗传法则被重新发现。1905 年 Wilson 发现性别与染色体的关系,魏斯曼(Weissman)推测遗传单位有序地排列在染色体上。在这些理论基础上,德国的 Borveri 同美国的 Sutton 不谋而合地提出遗

传的染色体学说，把染色体的行为同孟德尔的遗传因子联系起来。1910 年摩尔根(Morgan)做了大量的实验遗传学工作，证明基因是决定遗传性状的基本单位，而且直线排列在染色体上，建立了基因学说。以上这些大师的工作使细胞学与遗传学结合起来，奠定了细胞遗传学的基础。

细胞遗传学主要从细胞学角度，特别是从染色体的结构和功能，以及染色体和其他细胞器的关系来研究遗传现象，阐明遗传和变异的机制。其核心就是染色体－基因学说。直至现代生物学的崛起，特别是细胞生物学与分子遗传学学科的建立，细胞遗传学的研究主题始终沿着染色体结构与基因关系这一主轴前进。但染色体和基因的概念与研究内容已发生了根本的变化，基因在染色体上的定位、人工染色体与染色体工程、由基因人工诱变与点突变、基因剔除与负显性突变等等层出不穷的技术的发展，可以认为已把细胞遗传学的研究推向新的高度。染色体结构功能与基因表达关系的研究，在今后相当长时间内仍是主题。

（二）细胞生理学的研究

19 世纪末叶以来，对活细胞的细胞质流动、变形运动、纤毛与鞭毛运动和肌肉收缩等方面进行了研究。其后随着生理学技术的发展，在细胞膜及其通透性、细胞的应激性与神经传导等方面开展了大量研究。

1909 年 Harrison 和 Carrel 创立了组织培养技术，为研究细胞生理学开辟了一条重要途径。

1943 年 Claude 用高速离心机从活细胞内把核和各种细胞器，如线粒体、叶绿体分离出来，分别研究它们的生理活性，这对研究细胞器的功能和化学组成，以及酶在各细胞器中的定位起了很大的作用。

细胞生理学主要是研究细胞对其周围环境的反应，细胞生长与繁殖的机制，细胞从环境中摄取营养的能力，机体代谢功能与其复制方法，细胞的兴奋性、收缩性、分泌和细胞活动的其他表现机制，生物膜的主动运输和能量传递与生物电等。随着现代生物学的快速发展，细胞生理学这一分支学科似乎在逐渐地淡化。但其研究内容在不断延伸，物质跨膜运输与分选、信号跨膜转导与细胞内信号传递等等已成为当前细胞生物学的重要热点。也可认为这是细胞生理学研究与其他学科交融发展的结果。

（三）细胞化学

早期对生物体化学成分和基本生化反应的研究，是脱离细胞的形态结构而进行的。1924 年福尔根(Feulgen)等首先用 Feulgen 反应法专门作为脱氧核糖核酸(DNA)的定性方法。此后 1940 年 Brachet 用甲基绿－派洛宁染色方法来测定细胞中的 DNA 与 RNA。1936 和 1940 年 Casperson 用紫外光显微分光光度法测定 DNA 在细胞中的含量，并认为蛋白质的合成可能与 RNA 有关。细胞组分分离技术、放射自显影技术和超微量分析等方法的广泛运用，对细胞内核酸与蛋白质的代谢作用研究也有很大的促进作用。细胞化学这一分支学科一直保持着强劲的发展趋势，尤其在近 20 年，由显微分光光度计到流式分光光度检测技术，由放射自显影到分子定位杂交技术，由免疫荧光与免疫胶体金技术到激光

共焦点扫描显微镜技术等，使细胞成分，特别是核酸与蛋白质的定性、定位、定量以及动态变化研究达到空前的精确性与专一性。

上述实验细胞学分支学科并没有停步不前，其内容与内涵也在不断地发展与演变，直至现在还是细胞生物学的重要组成部分。除上述细胞学的分支外，细胞生物化学、细胞病理学、微生物细胞学与原生动物细胞学等也得到了相应的发展。

五、细胞生物学学科的形成与发展

20 世纪 50 年代以来，电子显微镜与超薄切片技术相结合，产生了细胞超微结构学这一新兴领域。从 50 年代中期至 60 年代末，细胞超微结构研究所积累的资料，使细胞结构的知识在很大程度上得到了更新，大大加深与拓宽了对细胞的认识。不仅对已知的细胞结构，诸如线粒体、高尔基体、细胞膜、核膜、核仁、染色质与染色体结构的了解出现了全新的面貌，而且发现了一些新的重要的细胞结构，如内质网、核糖体、溶酶体、核孔复合体与细胞骨架体系等等，为细胞生物学学科早期的形成奠定了良好的基础。此外，20 世纪 50～60 年代以来，生物化学与细胞学的相互渗透与结合，细胞生物化学这一领域的快速发展，使人们对细胞结构与功能相结合的研究水平达到了前所未有的高度。由于超微结构学与细胞生物化学这两个领域的蓬勃发展，积累了丰富的资料，人们对细胞的概念也发生了极大的变化，逐渐认识到细胞的知识是各生物学科的共同基础知识。更由于 20 世纪 70 年代以来，科学家将分子生物学的概念与技术引进细胞学，为细胞生物学这门学科的最后形成与建立创造了全新的局面。“细胞生物学”这个词是在 60 年代出现的，究竟是谁先提出来的并不是很重要，重要的是它的研究内容完全在新的高度上拓展了。这门学科概括地说，是以细胞作为一切有机体进行生命活动的基本单位这一概念为出发点，在各个层次上(主要是分子水平上)研究细胞生命活动的基本规律的学科，它是生命科学的基础。

80 年代以来，细胞生物学的主要发展方向是细胞的分子生物学(或称分子细胞生物学)，也就是说，在分子水平上探索细胞的基本生命规律，把细胞看成是物质、能量、信息过程的结合，并在分子水平上深入探索其生命活动规律，深刻性与综合性是细胞生物学进一步发展的特点。

诺贝尔医学或生理学奖与化学奖最能集中地反映当代生物科学的巨大成就。综观与分析 20 多年来诺贝尔医学或生理学奖与化学奖的课题内容，很多都是与深刻揭示细胞生命活动的规律有关的。而透射电子显微镜、扫描电子显微镜与扫描隧道显微镜的发明(均获诺贝尔物理学奖)为细胞生物学学科的建立以及将来的发展起着重要的推动作用。

六、细胞生物学的主要学术组织、学术刊物与教科书

为了促进细胞生物学学科的发展与国际交流，成立了世界性的细胞生物学国际联盟。从1976年开始，每4年举行一次代表大会，会议反映了细胞生物学研究的世界水平。此外，在欧洲和亚洲与太平洋等地区，也成立了相应的国际细胞生物学联盟。1990年在我国上海举行了首届亚洲与太平洋地区细胞生物学代表大会。为了促进我国细胞生物学的发展，我国于1980年也成立了中国细胞生物学学会。近20多年来，在我国还先后建立了细胞生物学专门的研究机构（研究所、室）与专业。为培养细胞生物学高层次人才，先后还建立了一批细胞生物学博士点与硕士点。我国在细胞生物学领域已取得很多成果，编写了10多种细胞生物学教学用书，并培养了一大批细胞生物学专门人才。

现在国际上创办了大量细胞生物学专门的或有关的学术刊物，根据近年发表的细胞生物学论文被引用的情况，选录下列主要学术刊物供参考：

Cell
Science
Nature
EMBO Journal
PNAS(Proceedings of National Academy of Science)
Journal of Cell Biology
Neuron
Annual Review of Cell Biology
Trends in Cell Biology
Plant Cell
Molecular and Cellular Biology
Molecular Biology of the Cell
Structure
Current Opinion Structural Biology
Journal of Cell Science
Cell Death and Differentiation
Cell Growth and Differentiation
Journal of Histochemistry and Cytochemistry
Experimental Cell Research
DNA and Cell Biology
Cell Motility and the Cytoskeleton
Cellular Physiology and Biochemistry
Journal of Cellular Biochemistry
Journal of Cellular Physiology

Protoplasma

Cell biology International Reports

在国内有关细胞生物学的主要学术刊物有：

《中国科学》

《科学通报》

《实验生物学报》

《细胞生物学杂志》

Cell Research

《遗传学报》

《解剖学报》

《微生物学报》

《植物学报》

《动物学报》

现在国际上较普遍应用的细胞生物学教学用书有：

Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: concepts and experiments. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999

Alberts B *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland publishing Inc., 1998

Alberts B *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing Inc., 1994

Darnell J *et al*. Molecular Cell Biology. 2nd ed. New York: W.H. Freeman Co. 1990

Avers C J. Molecular Cell Biology. Addison - Wesley Publ. Co., 1986

De Robertis E D P, De Robertis E M F. Cell and Molecular Biology. 7th ed. Philadelplphia: W B Saundors Co., 1980

Stephenson W K. Concepts in Cell Biology. New York: John Wiley and Sons., 1978

Han S S, Holmstedt J O V. Cell Biology. New York: McGraw - Hill, 1979

Karp C. Cell Biology. New York: McGraw - Hill, 1978

Swanson C P, Webster P L. The Cell. 4th ed. Engle Wood Cliffts: Prentice - Hall Inc., 1979

Gese A C. Cell Physiology. Philadelphia: W C Saunders Co., 1979

中国已经出版的细胞生物学主要教学用书有(非正式出版物不计入)：

郑国锠. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，(第一版)1982，(第二版)1992

郝 水. 细胞生物学教程. 北京：高等教育出版社，1982

翟中和. 细胞生物学基础. 北京：北京大学出版社，1987

汪德耀. 细胞生物学. 上海：上海科技出版社，1988

韩贻仁．分子细胞生物学．北京：高等教育出版社，1988

庄孝僡．细胞学（大百科全书分卷）．北京：中国大百科全书出版社，1988

杨抚华．医学细胞生物学概论．成都：四川科技出版社，1986

汪堃仁，薛绍白，柳慧图主编．细胞生物学．北京：北京师范大学出版社，（第一版）1990，（第二版）1998

郑国锠，翟中和主编．细胞生物学进展（共三卷）．北京：高等教育出版社，1989，1991，1994

谭曾鲁，周柔丽．医学细胞生物学．北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1992

宋今丹．医学细胞生物学．北京：人民卫生出版社，1994

汤雪明．医学细胞与分子生物学．上海：上海医科大学出版社，1995

翟中和主编．细胞生物学．北京：高等教育出版社，1995

翟中和主编．细胞生物学动态（共三卷）．北京：北京师范大学出版社，1995，1997，1999

提 要

细胞生物学是研究细胞生命活动基本规律的学科，它是现代生命科学的基础学科之一。细胞生物学研究的主要方面包括：① 细胞核、染色体以及基因表达的研究；② 生物膜与细胞器的研究；③ 细胞骨架体系的研究；④ 细胞增殖及其调控；⑤ 细胞分化及其调控；⑥ 细胞的衰老与编程性死亡（凋亡）；⑦ 细胞的起源与进化；⑧ 细胞工程。重点介绍了当前细胞生物学发展的总趋势和热点领域与方向。同时简略地介绍了现在国际与国内有关细胞生物学的学术刊物、教学用书与学术团体等。

回顾了细胞学与细胞生物学发展的简史，重点阐述了细胞学说的建立及其所起的承前启后的重要作用。细胞学与细胞生物学发展的历史大致可以划分为以下几个阶段：① 细胞的发现；② 细胞学说的建立；③ 细胞学的经典时期；④ 实验细胞学时期；⑤ 细胞生物学学科的形成与发展。分析了细胞生物学学科形成的基础与条件。当前细胞生物学主要发展方向是细胞分子生物学，它是以细胞作为一切有机体进行生命活动的基本单位这一概念为出发点，在各层次上（主要在分子水平上）研究细胞生命活动基本规律的学科。

思 考 题

1. 根据细胞生物学研究的内容与你所掌握的生命科学知识，客观地、恰当地估价细胞生物学在生命科学中所处的地位，以及它与其他学科的关系。

2. 通过学习细胞学发展简史，你如何认识细胞学说的重要意义？

3. 试简明扼要地分析细胞生物学学科形成的客观条件，以及它今后发展的主要趋势。

4. 当前细胞生物学研究的热点课题中你最感兴趣的是哪些？为什么？

参 考 文 献

1. Wilson E B. The Cell in Development and Heredity. 3rd ed. New York: The Macmillan Company, 1925, 1～18

2. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: concepts and experiments. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999

3. Alberts B *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publishing Inc., 1998

4. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 2nd ed. New York and London: Garland Publishing Inc., 1994

5. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular Cell Biology. 2nd ed. New York: W H Freeman Co., 1990. 1～14

6. 庄孝穗. 细胞学(中国大百科全书·生物学). 北京: 中国大百科全书出版社, 1988. 1～11

7. Proceedings of the VI International Congress for Cell Biology. San-Franisco, 1996

第二章

细胞基本知识概要

第一节　细胞的基本概念

一、细胞是生命活动的基本单位

在前人的著述中曾对细胞(cell)的概念下过各种各样的定义，大凡有以下一些提法：细胞是有机体形态结构的基本单位；细胞是形态与生理的基本单位；细胞是组成有机体的结构与功能的单位等等。以上这些定义从各个角度出发都有一定的道理。近年比较普遍的提法是：细胞是生命活动的基本单位。我们认为这一定义的概括性较强，内涵也更有深度。虽然对细胞的概念可以做各种各样的理解和解释，但我们认为应从以下一些角度去认识细胞作为生命活动基本单位这一概念。

(一) 一切有机体都由细胞构成，细胞是构成有机体的基本单位

一切有机体均由细胞构成，只有病毒是非细胞形态的生命体。单细胞生物的有机体仅由一个细胞构成。多细胞生物的有机体根据其复杂程度由数百乃至万、亿计的细胞构成。但有些极低等的多细胞生物体，如盘藻仅有4个、8个或几十个未分化的相同的细胞组成，它们实际上是单细胞与多细胞生物之间的过渡类型。高等动植物有机体由无数的功能与形态结构不同的细胞组成。有人统计，成人的有机体大约含有10^{14}个细胞，刚出生的婴儿机体约含有2×10^{12}个细胞。人的大脑是由10^{12}个细胞构成的复杂体系。1g哺乳动物的肝或肾组织大约有2.5～3亿个细胞。人体内大约有200多种不同类型的细胞，但根据其分化程度又可分为600多种。它们的形态结构与功能差异很大，但都是由一个受精卵通过分裂与分化而来。在多细胞生物机体内，功能相同的细胞群体构成机体的组织，应该指出，构成高等生物体的细胞虽然都是高度“社会化”的细胞，具有分工与协同的相互关系，但它们又保持着形态与结构的独立性，每个细胞具有自己独立的一套“完整”的结构体系，构成有机体的基本结构单位。

（二）细胞具有独立的、有序的自控代谢体系，细胞是代谢与功能的基本单位

在有机体一切代谢活动与执行功能的过程中，细胞呈现为一个独立的、有序的、自动控制性很强的代谢体系。在细胞内一切生化过程与试管内的生化过程的根本不同点是，细胞表现为有严格程序的、自动控制的代谢体系，这是由细胞自身结构的装置及其协调性所决定的，是长达数十亿年进化的产物，细胞结构完整性的任何破坏，都会导致细胞代谢的有序性与自控性的失调。虽然我们对细胞的知识领域还存在大片的空白，但我们却确信哪怕是一个最简单的细胞，也比任何迄今设计出的计算机控制的智能机更为精巧。

具有基本生物学知识的人都容易理解，各种分泌细胞的主要功能是合成分泌蛋白质或激素，都是以细胞作为基本的独立单位完成代谢过程的，它们都有保证完成这一过程的一套代谢装置。其他细胞也是如此。因此，我们可以把细胞看做是有机体代谢与执行功能的基本单位。

（三）细胞是有机体生长与发育的基础

一切有机体的生长与发育是以细胞的增殖与分化为基础的，这是研究生物发育的基点。近年认为细胞凋亡是生物生长发育不可缺少的平衡因素，与细胞增殖、分化具有互补作用。

有机体的生长与发育是依靠细胞的分裂，细胞体积的增长，细胞的分化与凋亡来实现的，不管这些过程如何的繁复，甚至很多现象与机理还处在朦胧的阶段，但毋庸置疑，细胞是生物生长与发育的基本单位。研究生物的生长与发育必须要以研究细胞的增殖、生长、分化与凋亡为基础。

（四）细胞是遗传的基本单位，细胞具有遗传的全能性

每一个细胞，不论低等生物或高等生物的细胞，单细胞生物或多细胞生物的细胞，结构简单或复杂的细胞，未分化或分化的细胞（除个别终末分化的细胞外），性细胞或体细胞，都包含着全套的遗传信息，即全套的基因，也就是说它们具有遗传的全能性。

由植物单个的生殖细胞或单个体细胞，由未受精的两栖类动物卵细胞，经人工培养与诱导可发育为完整的个体，曾经是细胞全能性最有力的证据之一。从动物的大部分组织游离分散出来的单个细胞，大多数可以在体外培养、生长、增殖与传代。虽然不能像植物细胞那样被诱导分化与发育为个体，但这些基本事实均可以说明，虽然细胞是构成统一有机体的小小的局部，并受到机体整体活动的制约。但每一个细胞在生命活动中又是一个小小的"独立王国"，在特定的条件下，它可以表现为独立的生命单位。近年通过哺乳动物已分化的体细胞克隆而被诱导发育为动物个体的事实，将细胞全能性的研究推向新的高峰，从而可以概括地说，每一种细胞都有发育为个体的潜在能力。

（五）没有细胞就没有完整的生命

无数实验证明，任何破坏细胞结构的完整性，都不能实现细胞完整的生命活动。众所周知，从细胞分离出的任何结构，甚至是保存完好的细胞核与含有遗传信息的线粒体和叶绿体，都不能在体外培养持续生存，并作为生命活动的单位而存在。

还可以用非常简单的事实来说明这一问题，假如我们将10个基因放在试管里，只要条件充分满足它们都可复制与表达。同样10个基因在细胞内就不一样了。它们是否能表达以及表达的程序将受细胞整体内环境在时间与空间上严格有序的控制。

除了上述的认识外，我们还必须强调，病毒虽然是非细胞形态的生命体，但它们必须在细胞内才能表现基本的生命特征（繁殖与遗传）。因此，就病毒而言，细胞是生命活动的基本单位这一概念也是完全合适的。

二、细胞概念的一些新思考

细胞是一切生命活动的基本单位，对细胞的认识与理解就成为一切生命科学的基础。由于细胞生物学与生命科学其他学科深刻的交叉，尤其与化学、物理与数学一些新概念的交叉，吸引了众多物理学与化学领域的科学工作者参与。从他们那里吸收一些概念，近年来我们对细胞的概念提出一些新的补遗与思考。

细胞是多层次非线性的复杂结构体系。

细胞是物质（结构）、能量与信息过程精巧结合的综合体。

细胞是高度有序的，具有自装配与自组织能力的体系。

写到这里，读者一定会觉得言犹未尽，我们本来想在以上诸小题中做一些延伸与说明，然而在本书的大部分章节中，都将贯穿着对细胞这些概念的思考，不妨留给读者自己进一步思索这些问题的余地。

三、细胞的基本共性

细胞具有极其复杂的化学成分，在各个层次上构成极为精密的细胞结构体系，从而构建成生命活动的基本单位——细胞。

组成细胞的基本元素是碳（C）、氢（H）、氧（O）、氮（N）、磷（P）、硫（S）、钙（Ca）、钾（K）、铁（Fe）、钠（Na）、氯（Cl）与镁（Mg）等，这些化学元素构成细胞结构与功能所需要的许多无机化合物和有机化合物。最基础的生物小分子是核苷酸、氨基酸、脂肪酸与单糖，它们又构成核酸、蛋白质、脂质与多糖类等重要的生物大分子。这些生物大分子一般以复合分子的形式，如核蛋白、脂蛋白、糖蛋白与糖脂等组成细胞的基本结构体系。由脂蛋白构成的磷脂双分子层并镶嵌蛋白质的生物膜体系，由核酸和蛋白质分子构成的遗传信息的复制与表达体系，是构建任何类型细胞所必需的两大基本结构体系。真核细胞中还有骨架体系等。

构成各种生物机体的细胞种类繁多，形态结构与功能各异，其多样性无法计算，但作为生命活动基本单位的所有细胞却又有共同的基本点：

1. 所有的细胞表面均有由磷脂双分子层与镶嵌蛋白质构成的生物膜，即细胞膜。细胞膜使细胞与周围环境保持相对的独立性，造成相对稳定的细胞内环境，并通过细胞膜与周围环境进行物质交换和信号转导。在真核细胞内，细胞膜内陷演化为细胞的内膜体系，构建成各种以膜为基础的功能专一的细胞器。生

物膜也是细胞能量转换的基地。

2. 所有的细胞都有两种核酸：即 DNA 与 RNA，作为遗传信息复制与转录的载体。而非细胞形态生命体病毒只有一种核酸，即 DNA 或 RNA 作为遗传信息的载体。现在有愈来愈多的证据说明在生命的起源过程中，RNA 起了主导作用，它比蛋白质分子和 DNA 起源早。遗传信息的载体——核酸分化为 DNA 与 RNA，可能是细胞作为生命活动基本单位稳定存在的重要环节。双链 DNA 对遗传信息的永久储存与精密复制可能更具有稳定性，双链结构增强了修复能力；而 RNA 则专司遗传信息的转录与指导蛋白质分子的翻译。

3. 作为蛋白质合成的机器——核糖体，毫无例外地存在于一切细胞内，是任何细胞（除个别非常特化的细胞）不可缺少的基本结构，它们在翻译多肽链时，与 mRNA 形成多聚核糖体。最近发现，rRNA 在多肽合成中的催化作用是一件令人兴奋的事。

4. 所有细胞的增殖都以一分为二的方式进行分裂，遗传物质在分裂前复制加倍，在分裂时均匀地分配到两个子细胞内，这是生命繁衍的基础与保证。

第二节　非细胞形态的生命体——病毒及其与细胞的关系

病毒是非细胞形态的生命体，是迄今发现的最小、最简单的有机体。但所有的病毒必须要在细胞内才能表现出它们的基本生命活动。病毒与细胞相互关系的研究不仅具有重要理论意义，而且也是重大的医学实践问题。病毒与细胞在进化上的关系目前也是一个未解决的重要课题，因此病毒的知识对我们学习细胞生物学是重要的，有助于加深我们对生命与细胞概念的理解与认识。

一、病毒的基本知识

病毒（virus）主要是由一个核酸分子（DNA 或 RNA）与蛋白质构成的核酸-蛋白质复合体。有类似病毒的更简单的生命体，仅由一个有感染性的 RNA 构成，称为类病毒（viroid）。1980 年，还发现有一种称为朊病毒（prion）的更简单的生命体，仅由有感染性的蛋白质构成，目前对它的生命活动还知之甚少，至少它不能算是独立生命体。绝大部分病毒必须在电子显微镜下才能看到。病毒虽然具备了生命活动的最基本特征（复制与遗传），但不具备细胞的形态结构，是不"完全"的生命体。因为它们的主要生命活动必须在细胞内才能表现，在宿主细胞内复制增殖。病毒自身没有独立的代谢与能量转化系统，必须利用宿主细胞结构、"原料"、能量与酶系统进行增殖，因此，病毒是彻底的寄生物。病毒的增殖过程，主要是以病毒的核酸为模板进行复制、转录，并翻译成病毒的蛋白质，由这些物质装配成新的子代病毒。因此，一般把病毒的增殖称为复制。

根据病毒的宿主范围，可以分为动物病毒、植物病毒与细菌病毒（噬菌体）等，但目前并不依此作为分类根据。现在主要按病毒的核酸类型、形态大小、有

无包膜以及理化性质等特征分类。病毒的成分与结构较为简单，很多病毒仅由核酸与蛋白质组成，有不少病毒还含有一定量的脂质物质、糖复合物与聚胺类化合物，每个病毒仅含有一个核酸分子，即一个 DNA 分子或一个 RNA 分子，在一种病毒内两种核酸不能兼得，这是病毒的最基本特点之一，也是与细胞的最根本区别之一。根据核酸类型的不同，所有病毒可以分为两大类：DNA 病毒与 RNA 病毒。DNA 病毒所含的 DNA 分子又有双链 DNA 与单链 DNA 的区别；RNA 病毒所含的 RNA 分子也有单链 RNA 与双链 RNA 的区别。核酸在整个病毒成分中所占比例虽小，但不论是 DNA 还是 RNA 都是遗传信息的唯一储存场所，是病毒的感染单位。因此，在功能上，核酸是病毒最重要的成分。蛋白质在病毒中所占比例很大，它们主要构成病毒的壳体(capsid)，少数病毒还带有酶蛋白与糖蛋白。壳体与核酸构成病毒的核壳体(nucleocapsid)，又称核壳。病毒的壳体有

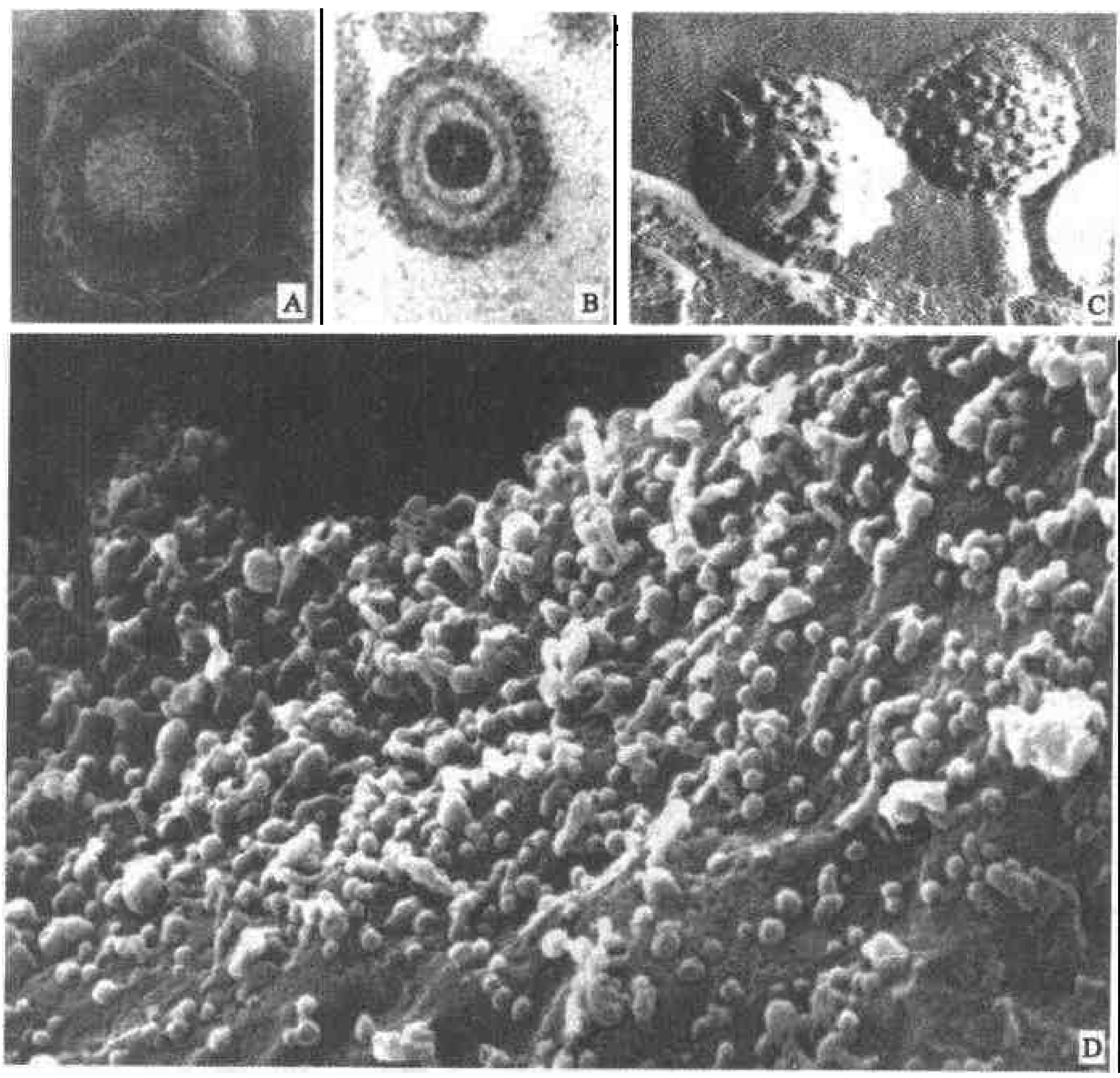


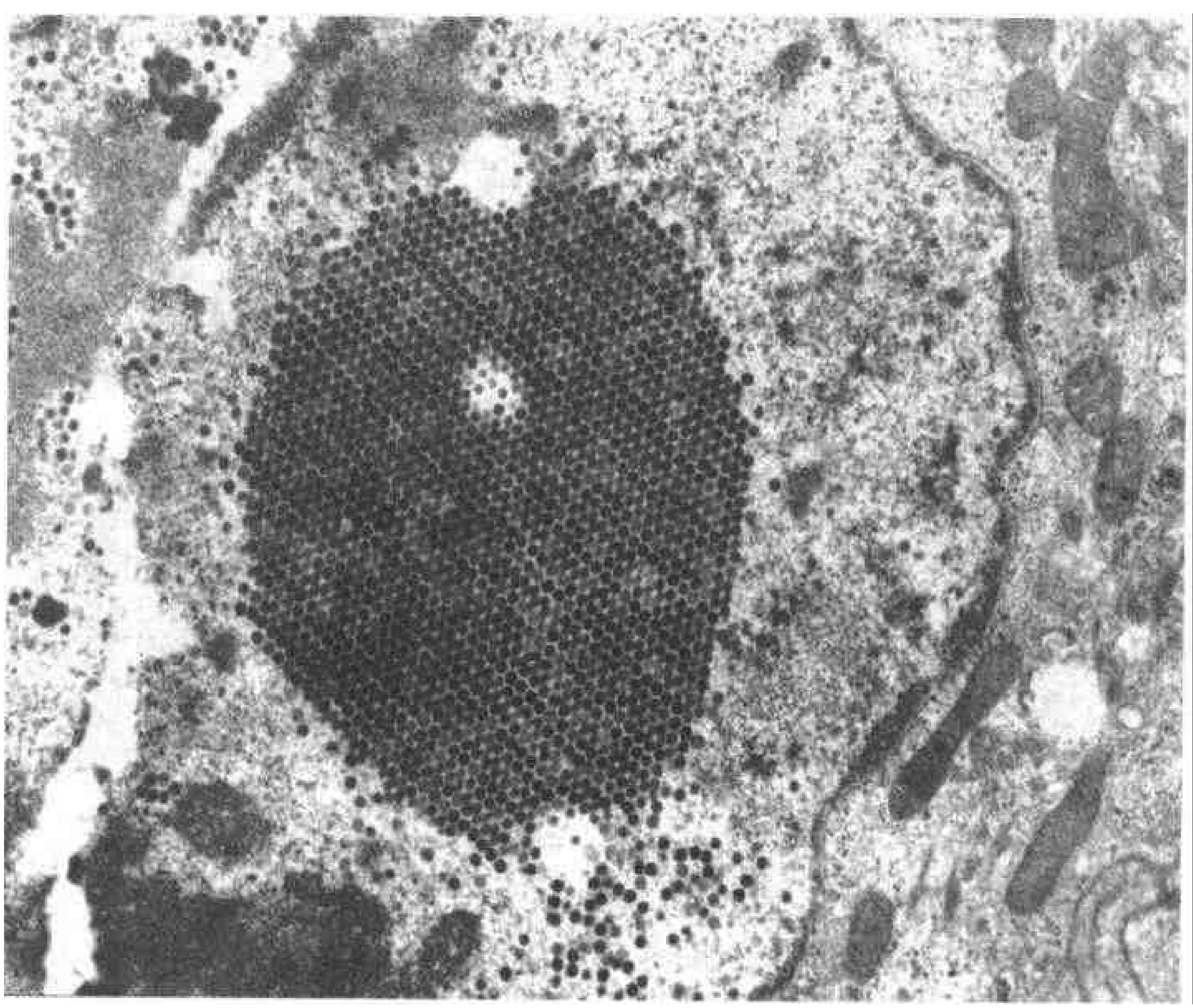
图 2-1　病毒的结构

疱疹病毒(牛鼻气管炎病毒)是一种典型的有包膜的立体对称型 DNA 病毒：A：经负染色的病毒粒子，可见核壳体之外包被着包膜；B：经超薄切片的病毒粒子，结构层次清晰，中央为 DNA 核心，电子密度很大，中间层为蛋白壳体，外层为脂蛋白的包膜；C：用冷冻蚀刻技术制备的病毒粒子，由于包膜的磷脂双分子层被揭开，可以见到镶嵌在包膜上的糖蛋白分子基团(以上照片均为放大 240 000 倍)；D：扫描电镜下可以观察到大量释放到细胞表面的成熟的病毒粒子，放大 20 000 倍(翟中和，丁明孝等)

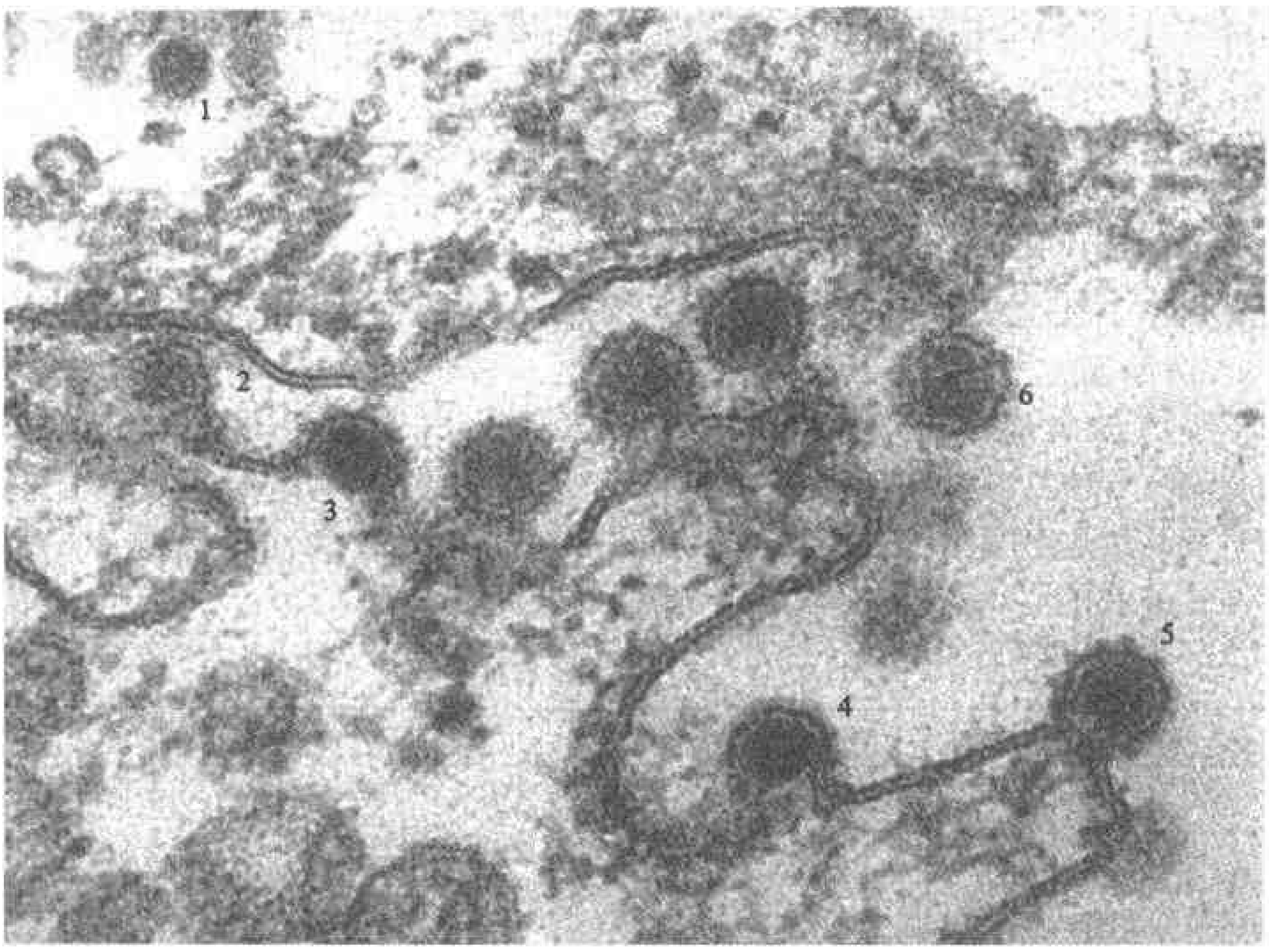
保护核酸的作用，而病毒的主要抗原性也是由壳体蛋白所决定的。壳体又由更小的形态单位（子粒）所构成。有些病毒在核壳之外，还有包膜（envelope），其主要成分为脂质与蛋白质，凡是有包膜的病毒对有机溶剂都很敏感，在有机溶剂作用下易灭活。在包膜表面具有包膜小体，主要成分为糖蛋白类，有“识别”的功能，并具有一定的抗原性。应该指出，病毒的包膜与细胞膜在结构与功能上都有很大差异。根据动物病毒的形态主要可分为立体对称型与螺旋对称型。立体对称型病毒的壳体呈20面体，每一个面又呈三角形，核酸折叠在壳体之内。立体对称型的病毒有的有包膜，如疱疹病毒、披盖病毒等（图2-1）。有的无包膜，称为裸露病毒，如腺病毒、呼肠孤病毒、小DNA病毒与小RNA病毒等。螺旋对称型病毒的核酸不是简单地填充在壳体内，是核酸与壳体的子粒按特殊的结构方式结合在一起的核壳体，大部分螺旋对称型的病毒均有包膜与包膜小体。粘液病毒、副粘液病毒、弹状病毒与白血病病毒等均为螺旋对称型病毒。

二、病毒在细胞内的增殖（复制）

病毒的增殖又称病毒的复制，与细胞一分为二的增殖方式是完全不一样的。病毒的增殖（复制）必须在细胞内进行。病毒在宿主细胞内分别复制病毒核酸与翻译病毒蛋白，然后将核酸与蛋白装配成病毒的基本结构（图2-2）。



A



B

图 2－2　病毒在细胞内的复制

A:腺病毒是典型的无包膜的立体对称型 DNA 病毒,它们是在细胞核内复制与装配的;照片上显示出已装配好的腺病毒在核内呈晶格样排列;一个细胞内可繁殖数万个病毒,20 000 倍(翟中和);B:辛德毕斯病毒(SbV)是典型的有包膜的 RNA 病毒,由正二十面立体对称的核壳和脂蛋白包膜两部分组成;照片中 1 为病毒的核壳体,2～6 代表 SbV 出芽成熟的各个阶段,放大 170 000 倍(梁凤霞)

病毒在宿主细胞内的增殖(复制)是病毒生命活动与遗传性的具体表现。病毒的增殖过程首先是病毒侵入细胞,病毒核酸"篡夺"细胞 DNA 对代谢过程的"指导"作用,利用宿主细胞的全套代谢机构,以病毒核酸为模板,进行病毒核酸的复制与转录,并翻译病毒蛋白,然后装配成新一代的病毒颗粒,最后从细胞中释放出来,再感染别的细胞,开始下一轮的周期。凡结构装配完整的,并具有感染性的病毒才称为病毒颗粒或成熟病毒(virion)。

病毒的增殖过程简要叙述如下:

1. 病毒侵入细胞,病毒核酸的侵染

由于病毒与细胞表面的相互物理作用,病毒能随机地吸附在细胞表面。病毒能不能侵染细胞,首先决定于病毒表面的识别结构与敏感细胞表面的受体能否互补结合,即能否发生特异性的吸附。这是病毒侵入细胞的第一步。多数动物病毒进入细胞的主要方式是细胞以"主动吞饮"作用使病毒进入细胞。但有些有包膜的病毒,以其包膜与细胞膜融合的方式进入细胞。噬菌体侵染细胞时,仅将核酸注入细胞,壳体是不进入细胞的。

动植物病毒进入细胞后,在细胞的蛋白水解酶的作用下,壳体被裂解,释放

出核酸。RNA 病毒的核酸是在胞质内复制与转录的，多数 DNA 病毒的核酸(除痘病毒与虹病毒)转移进入核内进行复制与转录。

有很多病毒的核酸本身就具有侵染性，它们可以直接侵入细胞，并复制出完整的病毒。自身不带酶的病毒核酸一般均具有侵染性。

2. 病毒核酸的复制、转录与蛋白质的合成

病毒核酸的类型可以分为 4 种：双链 DNA 病毒、单链 DNA 病毒、双链 RNA 病毒、单链 RNA 病毒。其中单链 RNA 病毒又可分为侵染性 RNA 病毒、非侵染性 RNA 病毒，以及带有逆转录酶的单链 RNA 病毒(肿瘤病毒)。因此病毒核酸有 6 种复制类型，见表(2－1)。以上 6 组核酸类型的病毒，其复制的方式与过程显然是不同的，我们仅选择最富代表性的双链 DNA 病毒、单链 RNA 病毒与单链 RNA 肿瘤病毒(逆转病毒)为例加以叙述。

表 2－1　病毒的核酸复制类型

核酸复制类型	病毒所带的酶	病毒的科
双链 DNA		疱疹病毒、腺病毒、多瘤病毒、痘病毒、虹病毒
单链 DNA		细小 DNA 病毒
双链 RNA	转录酶	呼肠孤病毒
侵染性单链 RNA		小 RNA 病毒
非侵染性单链 RNA	转录酶	粘液病毒、副粘液病毒、弹状病毒等
逆转病毒单链 RNA	逆转录酶	逆转病毒

(1) 当 DNA 病毒进入细胞后，在宿主细胞蛋白水解酶(脱衣酶)的作用下，蛋白质壳体裂解，释放出 DNA。被释放的 DNA 分子进入细胞核，在病毒 DNA 的指导下，利用宿主细胞的代谢系统首先翻译“早期蛋白”。早期蛋白的主要功能之一是关闭宿主细胞的基因调控，抑制宿主细胞本身的核酸复制与转录，以及蛋白质的合成。另一种“早期蛋白”可能是病毒特异性的聚合酶，在这些酶的催化作用下，以病毒 DNA 为模板复制新的 DNA，并转录带有病毒遗传信息的 mRNA，mRNA 与宿主细胞的核糖体相结合，按病毒的遗传信息，翻译病毒的结构蛋白，这样就为子代病毒的装配准备了物质基础。

(2) RNA 病毒颗粒进入宿主细胞后，在脱衣酶的作用下，壳体裂解，释放出 RNA。病毒 RNA 分子本身首先可以作为模板，利用宿主细胞的代谢系统，翻译出“早期蛋白”。这种早期蛋白的功能与上述 DNA 病毒的“早期蛋白”相同，一方面抑制宿主细胞 DNA 的复制与转录，同时在早期蛋白提供的聚合酶的催化作用下，以病毒 RNA 分子自身为模板复制新的 RNA 分子，同时又转录 mRNA。带有病毒遗传信息的 mRNA 与宿主细胞的核糖体相结合，翻译病毒的结构蛋白，新复制的 RNA 与翻译的病毒蛋白装配成子代病毒颗粒，以上整个过程都是在细胞质内进行的。

(3) 引起细胞转型的 RNA 肿瘤病毒，其复制过程与上述有根本的不同。当病毒进入细胞，壳体裂解与释放 RNA 后，首先以病毒 RNA 分子为模板，在反转录酶(病毒自身所携带)的催化作用下，反转录出病毒的 DNA 分子，这种病毒

DNA能与宿主细胞染色体的DNA链结合(称为整合),又以整合在细胞DNA上的病毒DNA为模板,转录新的病毒RNA与病毒mRNA,后者与核糖体结合,翻译出各种病毒蛋白,其中包括病毒的结构蛋白与导致宿主细胞转型的蛋白。其结果:或是装配成新的子代病毒,宿主细胞裂解;或是导致细胞发生转型,转化为肿瘤细胞。

由RNA作为模板反转录为DNA的过程是生物科学中的一个重大发现,这一发现是在研究肿瘤RNA病毒与宿主细胞相互作用关系时所取得的。

3. 病毒的装配、成熟与释放

病毒的装配与成熟是完成繁殖的最后的重要环节,病毒的核酸与蛋白质在宿主细胞内分别合成,两者装配成核壳体。

无包膜的立体对称型病毒,当其核酸与蛋白质装配成核壳时,就成为具有感染性的完整病毒粒子。对这些病毒来说,装配就是成熟。有包膜的病毒,当其核酸与壳体蛋白装配成核壳体后要穿过细胞膜而释放,核壳体外包上一层细胞膜而成为病毒的包膜,包膜实际上是特化的细胞膜。

许多无包膜的病毒,如腺病毒、小RNA病毒、小DNA病毒等,释放的速度很快。当病毒释放时,引起细胞崩解。有包膜的病毒是以出芽的方式释放,是细胞膜外卸的一种方式,是逐步释放的。

从病毒侵入细胞到子代病毒的成熟释放称为一个增殖周期(或复制周期),对不同的病毒,其增殖周期长短不一。小RNA病毒仅需2 h多,疱疹病毒约10～15 h,腺病毒约14～25 h。每一个细胞内能复制装配多少病毒?不同的病毒不一样。根据我们电镜观察统计,小RNA病毒、小DNA病毒与腺病毒在每个宿主细胞内能复制装配数以万计的病毒,而疱疹病毒与粘液病毒在每个宿主细胞内只能复制数千个病毒,痘病毒更少。应该指出,并不是每个病毒都具有感染性。

病毒在细胞内的增殖过程是病毒与细胞相互作用的极为复杂的过程,也是宿主细胞结构功能进行重大改组的过程。绝大多数病毒在细胞内复制时,可以在显微镜下见到致宿主细胞病变(cpe),也有极少数病毒(如猪瘟病毒),虽在组培细胞内复制装配并释放,但并不引起细胞明显的变化,甚至细胞可以带毒分裂繁殖。当病毒侵入细胞后,以一个核酸分子为模板复制大量的子代病毒时,首先要关闭细胞的基因调控系统,"篡夺"细胞DNA的指导作用,同时改装宿主细胞的结构与功能,为适应病毒的复制"服务"。因此,被感染的细胞,必然要发生一系列重大结构的变化。以病毒为"探针"或以病毒基因组作为外源基因研究病毒与细胞的相互关系,在理论与实践上都是十分重要的。病毒癌基因导致细胞癌变过程的研究曾经是最吸引人的课题之一。

三、病毒与细胞在起源和进化中的关系

病毒是非细胞形态的生命体,它的主要生命活动必须要在细胞内实现。病

毒与细胞在起源上的关系是人们很感兴趣的问题，目前存在 3 种主要观点：

生物大分子──→病毒──→细胞

生物大分子──→┬→病毒
└→细胞

生物大分子──→细胞──→病毒

在 30 多年前，第一种观点占主要优势。过去长期认为病毒是生物与非生物的桥梁，病毒具有生物与非生物的两重性，因此按逻辑推理，必然是生物大分子先形成病毒，再由病毒进化为细胞。可是当病毒学这门知识深入发展以后，上述观点难以解释很多根本问题。现在第二种与第三种观点比较容易接受，而且第三种观点越来越具有说服力。

认为病毒是细胞的演化产物的观点，其主要依据与论点如下：

1. 由于病毒的彻底寄生性，所有病毒毫无例外，必须要在细胞内复制与增殖，才能表现其基本生命现象，没有细胞的存在也就没有病毒繁殖。因此病毒决不可能起源在细胞之先，只能是先有细胞后有病毒。

2. 已经证明，有些病毒（如腺病毒）的核酸与哺乳动物细胞 DNA 某些片段的碱基序列十分相似。癌基因的发现及其研究的深入加强了这种观点。因为细胞癌基因（cellular oncogene）与病毒癌基因（viral oncogene）具有相似的同源序列，从而普遍认为病毒癌基因起源于细胞癌基因。

3. 病毒可以看做是 DNA 与蛋白质或 RNA 与蛋白质形成的复合大分子，与细胞内核蛋白分子有相似之处。

由此推论：病毒可能是细胞在特定条件下"扔出"的一个基因组，或者是具有复制与转录能力的 mRNA。这些游离的基因组，只有回到它们原来的细胞内环境中才能进行复制与转录。

第三节 原核细胞与古核细胞

在种类繁多、浩如烟海的细胞世界中，根据其进化地位、结构的复杂程度、遗传装置的类型与主要生命活动的方式，可以分为原核细胞（prokaryotic cell）与真核细胞（eucaryotic cell）两大类。这一确切概念是在 20 世纪 60 年代由著名细胞生物学家 H. Ris 最早提出来的。把细胞划分为原核细胞与真核细胞两大类型的概括，不仅对细胞生物学，而且对整个现代生命科学均具有深远影响。

顾名思义，原核细胞因没有典型的核结构而得名，然而原核细胞与真核细胞的区别还不仅如此。由此延伸而把整个生物界划分为原核生物（prokaryote）与真核生物（eukaryote），由原核细胞构成的有机体称为原核生物，几乎所有的原核生物都由单个原核细胞构成，而真核生物却可以分为多细胞真核生物与单细胞真核生物。

原核细胞没有典型的细胞核，即没有核膜将它的遗传物质与细胞质分隔开。

原核细胞最基本的特点可以概括为两点:① 遗传的信息量小,遗传信息载体仅由一个环状DNA构成;② 细胞内没有分化为以膜为基础的具有专门结构与功能的细胞器和细胞核膜。以上基本特点决定了原核细胞其他一系列特征。原核细胞的体积一般很小,直径由 0.2～10μm 不等。原核细胞的进化地位显然比较原始,大约在35亿年前在地球上就出现了;现在在地球上的分布广度与对生态环境的适应性比真核生物大得多。

近20年来,大量的分子进化与细胞进化的研究说明,原核生物在极早的时候就演化成了两大类:称为古细菌(原细菌 archaeobacteria)与真细菌(eubacteria)。古细菌可能是细胞生存的更为原始的类型。现在将古细菌称为古核生物(archacon),古核生物细胞的形态结构与遗传结构装置和原核细胞相似,但有些分子进化特征更接近真核细胞。有些生物学家建议将生物划分为原核生物、古核生物与真核生物三大界,将细胞相应分为三大类型:原核细胞、古核细胞与真核细胞。

真细菌实际应包括我们所知的绝大部分原核生物,而古核生物(古细菌)是一些生长在地球上特殊环境中的细菌,它们可能代表了原始地球环境中生命存在与繁衍的特定形式。正因为如此,近10多年对古核细胞的研究,引起进化生物科学工作者的很大关注,很自然就成为细胞起源与进化研究领域的热点。人类认识原核细胞是从细菌开始的,但长期以来把细菌仅作为微生物的代表来研究,很少把细菌作为原核细胞来研究。近代分子生物学与细胞生物学的发展,尤其是遗传工程技术的建立主要是从原核细胞开始的,因此细菌就成为原核细胞的主要代表之一了。然而应该指出,原核细胞的范畴应更广、更多样性,包括支原体、衣原体、立克次氏体、细菌、放线菌与蓝藻等多种庞大的家族。以前人们总把细菌与蓝藻作为原核细胞的主要代表,而我们认为有必要从最简单的细胞——支原体开始介绍,这有助于我们对细胞概念的更深入了解。

一、最小、最简单的细胞——支原体

支原体(mycoplast,近年又译为霉形体)是目前发现的最小、最简单的细胞。虽然它们是极为简单的生命体,却已具备了细胞的基本形态结构,并具有作为生命活动基本单位存在的主要特征。支原体能在培养基上生长,具有典型的细胞膜,一个环状的双螺旋DNA作为遗传信息量不大的载体,mRNA与核糖体结合为多聚核糖体,指导合成约700多种蛋白,这可能是细胞生存所必须的最低数量的蛋白。支原体是以一分为二的方式分裂繁殖。以上这些特征是与非细胞形态的生命体——病毒是根本不同的。支原体的体积很小,直径一般是 0.1～0.3μm,仅为细菌的十分之一。很多支原体能寄生在细胞内繁殖。最早发现的支原体为拟胸膜肺炎病原体——PPLO,然后又从动物、人体、污染的环境中分离出很多支原体,发现它们中不少是致病的病原体,尤其是一些慢性病(呼吸道病、胸膜肺炎、关节炎与尿道炎等)的病原体可能是支原体。后来又发现了很多植物

支原体(图 2－3)。

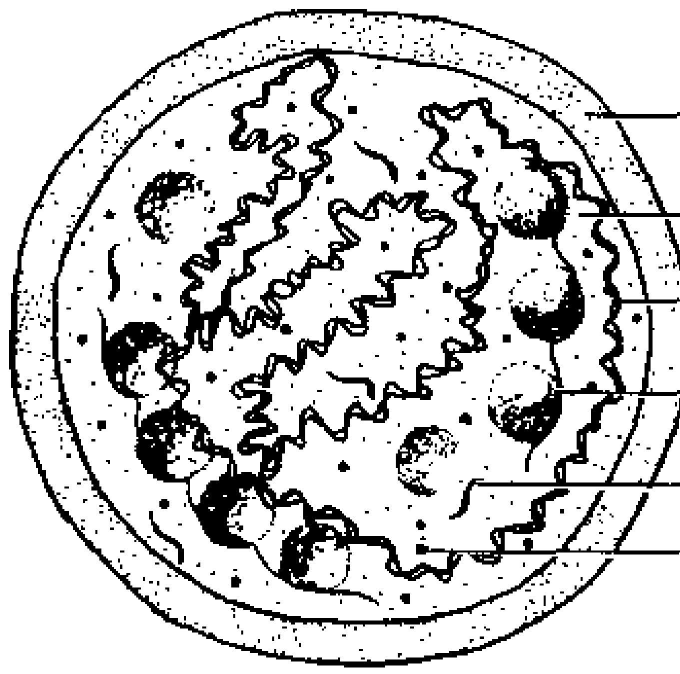


图 2　3　支原体模式图

目前没有发现比支原体更小更简单的细胞了,与它们的体积与结构近似的是立克次氏体与衣原体,但它们不能在培养基上生长。支原体除了具有作为细胞必需的结构外,几乎没有什么称得上结构复杂的装置了,当然它也有一些自己的特点:支原体具有多形态性,因为它没有细胞壁,形态可以随机变化。支原体的细胞膜与动物细胞膜类似,但自身不能合成长链脂肪酸或不饱和脂肪酸,必须依赖生长培养基提供外源脂肪酸来合成膜的脂质。细胞膜厚约 10 nm,具有原核细胞膜所具有的多功能性。支原体的环状双螺旋 DNA 较均匀地散布在细胞内,没有像细菌一样的核区。作为蛋白质合成的"机器",核糖体是在电镜下唯一可见的细胞内结构。我们曾对山羊胸膜肺炎支原体细胞内的核糖体进行过数量统计,每个细胞约含 800～1 500 个核糖体。已在支原体细胞内发现 40 多种酶,其中包含有葡萄糖转变为丙酮酸代谢所必需的一整套酶系。综上所述,支原体的基本结构与机能已简单到极限,以致人们不禁要问,这样微小与简单的细胞是否具有完善的分子装置,是否能像其他细胞一样进行全部必要的生命化学过程?作为细胞独立生存所需要的空间(细胞体积)的最小极限应是多大?为什么说支原体是最小、最简单的细胞?

一个细胞生存与增殖必须具备的结构装置与机能是:细胞膜、遗传信息载体 DNA 与 RNA、进行蛋白质合成的一定数量的核糖体以及催化主要酶促反应所需要的酶,这些在支原体细胞内已基本具备。从保证一个细胞生命活动运转所必需的条件看,有人估计完成细胞功能至少需要 100 种酶,这些分子进行酶促反应所必须占有的空间直径约为 50 nm,加上核糖体(每个核糖体直径约 10～20 nm),细胞膜与核酸等,我们可以推算出来,一个细胞体积的最小极限直径不可能小于 100 nm,而现在发现的最小支原体细胞的直径已接近这个极限。因此,作为比支原体更小、更简单的细胞,又要维持细胞生命活动的基本要求,似乎是

不可能存在的，所以说支原体是最小、最简单的细胞。

二、原核细胞的两个代表——细菌和蓝藻

从20世纪60年代开始，细菌与蓝藻一直是研究原核细胞的两个典型代表。我们对原核细胞的深入了解，也主要依靠细菌与蓝藻的细胞生物学与分子生物学研究资料的积累。本节主要从细胞生物学角度来介绍细菌与蓝藻的知识。

（一）细菌细胞

细菌是自然界分布最广、个体数量最多、与人类关系极为密切的有机体，在大自然物质循环过程中处于极重要的地位。细菌有3种形态：球状或椭圆形称为球菌，杆状或圆柱形称为杆菌，螺旋形或弧形称为螺旋菌。绝大多数细菌的直径在0.5～5.0μm之间，当然还有极少的巨型细菌。在进化上，细菌又可分为原细菌（古细菌）与真细菌两大类。

在细胞分子生物学研究领域，人们对大肠杆菌（*E.coli*）的认识可能比其他任何原核生物都要深入与透彻。因此介绍细菌细胞时，很多分子生物学方面的工作来自对大肠杆菌的研究资料。

本小节的重点是介绍细菌细胞的结构与功能。细菌细胞没有典型的核结构，但绝大多数细菌有明显的核区或称类核（nucleoid），主要由一个环状DNA分子盘绕而成，核区四周是较浓密的胞质物质。除了核糖体外，没有类似真核细胞的细胞器。细菌细胞膜是典型的生物膜结构，但它具有多功能性。

1．细菌细胞的核区与基因组

细菌细胞只具有原始形态的核，没有核膜，更没有核仁，结构简单，为了与真核细胞典型的核有所区别，称为核区或类核。细菌细胞DNA主要盘绕在核区，细菌的核区实际主要由一个环状的DNA分子组成。由于细菌基因的排列与DNA有对应的结构关系，延用了真核细胞的染色体概念，习惯地称之为细菌染色体，然而它比真正的染色体结构简单得多，没有或只有极少的组蛋白与DNA结合。正常情况下，一个细菌细胞内只有一个核区，在细菌处于生长增殖状态时，由于DNA的复制次数与细胞分裂次数并不同步，一个细胞内可以同时存在几个DNA分子，往往出现几个核区。

在光学显微镜下，核区经特殊染色可以呈现为各种形状，但没有强的Feulgen正反应，说明它与真核细胞核不一样。在高分辨电镜下，可以看到核区是DNA分子形成的丝状结构。

在不到一立方微米的核区空间内，折叠着长达1 200～1 400μm的环状DNA，所含的遗传信息量足够编码2 000～3 000种蛋白，因此细菌DNA的空间构建是十分精巧的：以*E.coli*为例，其基因组由4.2×10^6核苷酸对组成，包含2 350个基因，目前已有近1 000个基因的功能已被弄清楚，并确定了其在基因图谱上的位置。

现在把细菌的环状DNA或染色体也可以理解为细菌基因组（genome），因

为基因组的定义已被赋予新的内容，基因组——“自主复制”的单位应具有的一套基因。一般情况下，细菌的基因组是作为具有一个复制起始点的独立单位而进行复制，因此它可以被看做为一个复制子(replicon)。大多数细菌 DNA 都呈双螺旋，遵循环状 DNA 分子双向复制的方式进行复制。环状 DNA 分子在环上特定的起始点首先形成一个复制“泡”，随之沿着环的两个方向进行复制，“泡”逐渐扩大，形成像希腊字母“θ”的形状，所以将环状 DNA 的双向复制模式称为 θ 模型。遵循半保留复制规律，最终由一个 DNA 环复制为两个子环，每个子环保留一个亲本分子链，另一条是新合成的互补链。细菌 DNA 复制时，DNA 环附在细菌质膜上作为支持点。细菌 DNA 的复制不受细胞分裂周期的限制，可以连续进行，不像真核细胞 DNA 复制仅局限在细胞周期的特定阶段(S 期)进行。

由于细菌细胞没有核膜把核与细胞质绝对地分开，DNA 复制、RNA 转录与蛋白质合成的结构装置没有在位置上截然分开，因此基因复制、转录与表达过程没有严格的时间上的阶段性与位置上的区域性。换句话说，DNA 复制、RNA 转录与蛋白质翻译可以同时进行，这是细菌乃至整个原核细胞与真核细胞最显著的差异之一。电镜分子形态图可以显示，DNA 分子边复制边转录，转录的 mRNA在没有脱离 DNA 的状态下，又与核糖体结合翻译肽链。基因的复制与表达在时间与空间上是连续进行的。

2. 细菌细胞的表面结构

细菌细胞的表面主要是指细胞膜、细胞壁及其特化结构：中膜体、荚膜与鞭毛等。细胞膜是细胞表面的最重要结构(图 2－4)。

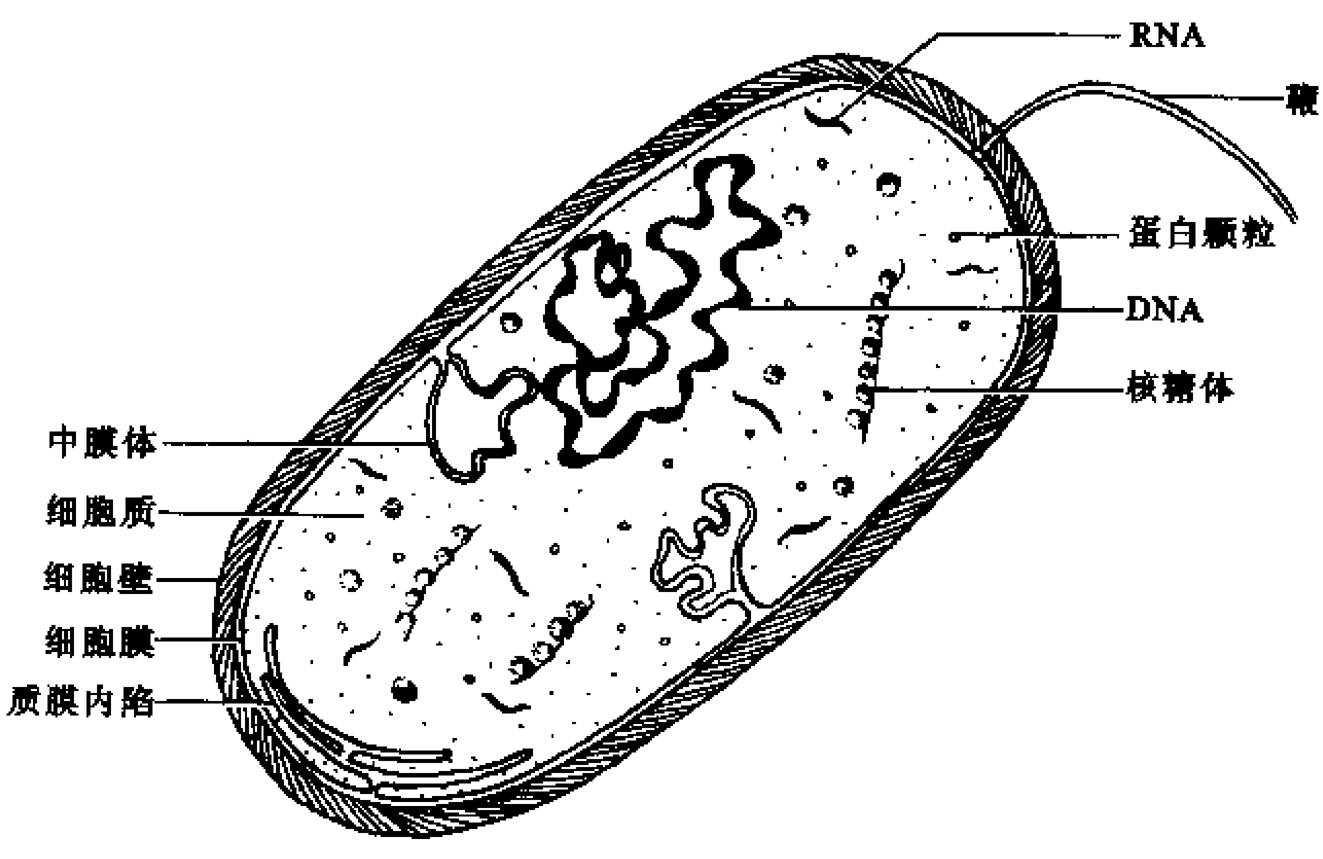


图 2－4 细菌模式图

(1) 细胞膜

细胞膜又称质膜，是包围细菌原生质的典型生物膜，由磷脂双分子层与镶嵌

蛋白质构成的富有弹性的半透性膜。膜厚约 8～10 nm，外侧紧贴细胞壁。细胞膜的主要功能是选择性地交换物质：吸收营养物质，排出代谢废物，并且有分泌与运输蛋白质的作用。近年有关蛋白质跨膜运输机制的研究，其中一例是由小鼠胰岛素原基因转入 *E. coli* 后，表达的胰岛素原是如何跨越 *E. coli* 细胞膜而部分被释放的。细菌细胞膜含有丰富的酶系，执行许多重要的代谢功能。细菌细胞膜的多功能性是区别于其他细胞膜的一个十分显著的特点，如细胞膜内侧含有电子传递与氧化磷酸化的酶系，具有执行真核细胞线粒体的部分功能。细胞膜内侧含有一些酶与核糖体共同执行合成向外分泌蛋白质的功能，细胞膜上还含有细胞色素酶与合成细胞壁成分的酶，使人们很容易推测细菌细胞膜具有相当于真核细胞内质网与高尔基体的部分功能。近年发现细菌细胞膜外侧有受体蛋白与酶，因此细菌细胞的识别问题也成为近年发展起来的研究课题。

(2) 中膜体

中膜体(mesosome)又称间体或质膜体，由细胞膜内陷形成，每个细胞内有一个或数个中膜体，其形状差异较大，在革兰氏阳性菌中更明显，中膜体与 DNA 有联系，推测中膜体可能起 DNA 复制的支点作用。细胞分裂时，先形成两个中膜体，然后核物质再一分为二。

(3) 细胞壁

细胞壁 cell wall 是位于细胞膜外的一层较厚、较坚韧并略具弹性的结构。所有细菌的细胞壁都具有的共同成分是肽聚糖，由乙酰氨基葡萄糖、乙酰胞壁酸与四五个氨基酸短肽聚合而成的多层网状大分子结构。革兰氏阳性菌与阴性菌的细胞壁成分与结构差异很明显，也是细菌呈革兰氏阳性反应与阴性反应的重要原因。革兰氏阳性菌细胞壁厚约 20～80 nm，层次不清楚，壁酸含量高达 90%；革兰氏阴性菌细胞壁厚约 10 nm，层次较分明，壁酸含量仅占 5%，但阴性菌细胞壁的其他成分却比阳性菌复杂。青霉素的抑菌作用主要是通过抑制壁酸的合成，从而抑制细胞壁的形成。阳性菌因细胞壁的壁酸含量极高，故对青霉素很敏感；反之，阴性菌由于壁酸含量极少，对青霉素不敏感。

细胞壁对细胞有保护作用，机械强度很高，革兰氏阳性菌的细胞壁能耐受 20 kg/cm^2 的压力。细胞壁对物质的交换起部分调节作用，细胞壁的成分与抗原性、致病性及对病毒的敏感性均有关系。

(4) 荚膜

荚膜是某些细菌表面的特殊结构，是位于细胞壁表面的一层松散的粘液物质。荚膜的成分因不同菌种而异，主要是由葡萄糖与葡萄糖醛酸组成的聚合物，也有的含多肽与脂质。荚膜对维持细胞的主要生命活动似无直接作用，但具有一定程度的保护作用，如保护细胞免受干燥的影响，保护病原菌免受细胞的吞噬。荚膜本身还可作为细胞的营养物质，在营养缺乏时能被细菌所利用。

(5) 鞭毛

鞭毛是某些细菌的运动器官，鞭毛的结构与真核生物的鞭毛完全不一样，结构十分简单，是由一种称为鞭毛蛋白(flagellin)的弹性蛋白所构成。

3. 细菌细胞的核糖体

每个细菌细胞约含 5 000～50 000 个核糖体，部分附着在细胞膜内侧，大部分游离于细胞质中。核糖体与 mRNA 形成多聚核糖体，是翻译肽链的结构。细菌核糖体的数量与细胞生理状态的关系极为密切，细菌分裂旺盛时，如在指数生长期，核糖体数量激增，总重量可达细胞干重的百分之几十，而细菌处于极度“饥饿”状态时，每个细胞内核糖体的数量可减少到几百个。细菌核糖体的沉降系数为 70S，由大亚单位(50S)与小亚单位(30S)组成，大亚单位含有 23S rRNA，5S rRNA 与 30 多种蛋白质，小亚单位含有 16S rRNA 与 20 多种蛋白质。近年来，发现核糖体所含大量蛋白质的功能是十分复杂的。30S 的小亚单位对四环素与链霉素很敏感，50S 的大亚单位对红霉素与氯霉素很敏感，这些抗生素大概是通过多肽链翻译这一环节起抑菌作用的。关于细菌细胞核糖体的成分、结构及其在多肽链翻译过程中的具体作用，在本书第九章中将有详细的叙述，在此不作赘述。

4. 细菌细胞核外 DNA

在细菌细胞内除上述的核区 DNA 外，还存在可进行自主复制的遗传因子，称为质粒(plasmid)。质粒是裸露的环状 DNA 分子，所含遗传信息量为 2～200 个基因，能进行自我复制，但它们的复制能力或多或少依赖于宿主细胞的机能，有时质粒能整合到核 DNA 中去。研究得较多的大肠杆菌性因子(*f* 因子)，大肠杆菌素因子(*col* 因子)与抗药因子(*r* 因子)等都是由质粒基因编码的。细菌可以失去质粒 DNA 而无妨于正常代谢活动。质粒 DNA 在遗传工程研究中很重要，常用作基因重组与基因转移的载体。

5. 细菌细胞内生孢子

某些细菌处于不利的环境，或耗尽营养时，就容易形成内生孢子，又称芽孢，是对不良环境有强抵抗力的休眠体。细菌细胞内的重要物质，特别是 DNA，积聚在细胞的一端，形成一种含水量较丰富的致密体，外被很厚的壁，内生孢子折光性很强，不易染色，具有度过恶劣环境的能力，可以在杀死普通细菌或营养型细菌的条件下依然存活。细菌的增殖方式极为简单，先是核区 DNA 与中膜体接触，环状 DNA 以膜为支点，按双向复制方式复制为两个 DNA 子环，此时中膜体一分为二，遗传物质随之均匀地一分为二，形成两个核区，细胞膜在两个核区之间凹陷、延伸，将两个子细胞分隔开，最后形成新的细胞壁。这种分裂虽称直接分裂，但很多特征是细菌细胞所特有。

(二) 蓝藻细胞

蓝藻又称蓝细菌(Cyanobacteria)，是原核生物，又是最简单的自养植物类型之一。它能进行与高等植物类似的光合作用(以水为电子供体，放出 O_2)，与光合细菌的光合作用的机制不一样。蓝藻细胞没有进行光合作用的专门细胞器——叶绿体，仅有十分简单的光合作用结构装置。蓝藻细胞的遗传信息载体与其他原核细胞一样，是一个环状 DNA 分子，但遗传信息量很大，可与高等植物相比。蓝藻细胞的体积比其他原核细胞大得多，直径一般在10μm左右，甚至可

达 70μm(如颤藻)。蓝藻应属单细胞生物,但有些蓝藻经常以丝状的细胞群体存在。中国人食用的"发菜"就是蓝藻的丝状体;绿肥红萍就是一种固氮蓝藻与水生蕨类满江红的共生体。

蓝藻分布十分广泛,在淡水、海洋、高山、极地、沙漠、草原与森林都有蓝藻生活的足迹,它们能生长在极为贫瘠的环境下。蓝藻细胞内含有丰富的色素,如藻蓝素与叶绿素,使细胞呈绿色。有些种类的蓝藻还含有黄色色素、红色色素,随细胞内各种色素含量不同,细胞也呈现各种不同颜色,虽都属于蓝藻,却不一定是蓝绿色。现将蓝藻细胞的基本特征扼要介绍于下(图 2-5)。

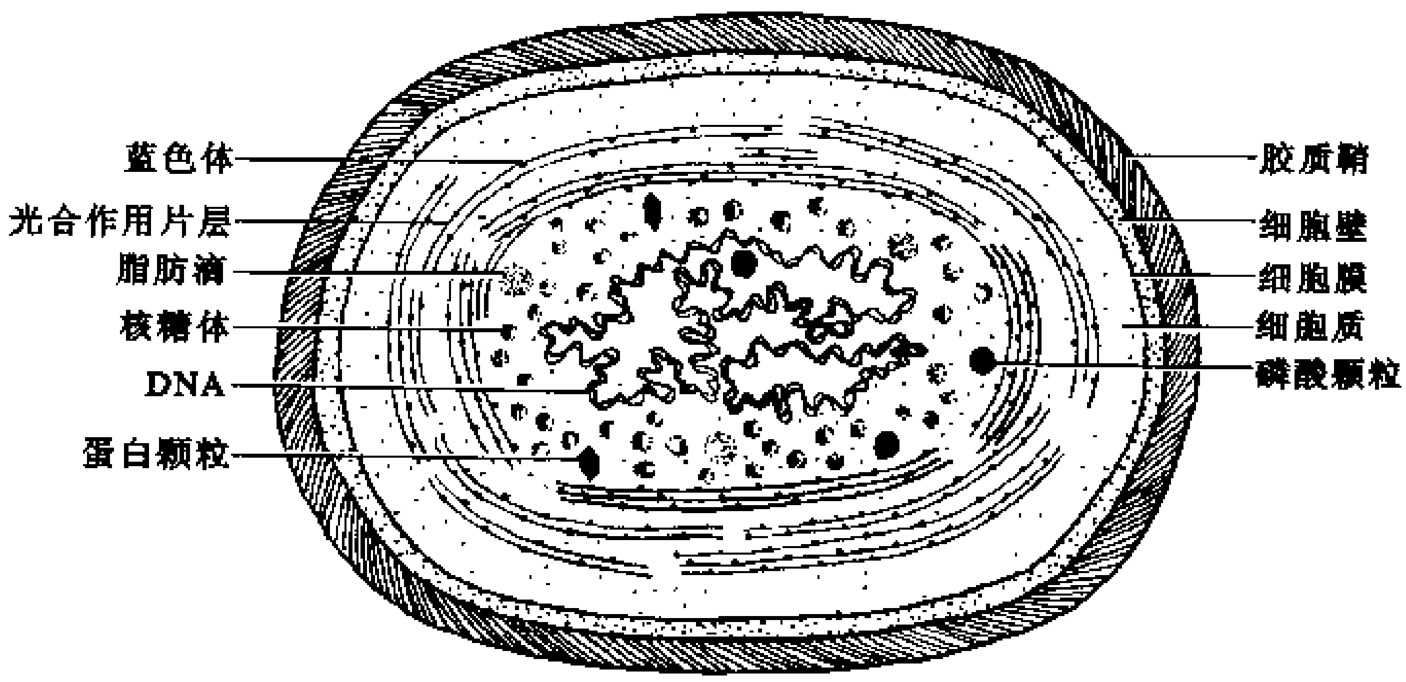


图 2-5 蓝藻模式图

(1) 中心质

在光镜下可以观察到蓝藻细胞中央部位较周围原生质明亮,是遗传物质 DNA 所在部位,它相当于细菌的核区,称为中心质或中央体。中心质的形态在不同种类和同一种类的不同发育时期往往变化很大,虽称"中心质",但经常也不位于中心。胞质与中心质之间无明确界限。蓝藻的 DNA 也为裸露的,不与碱性蛋白质结合,复制也是连续的,不局限于某一特定时间内进行。与细菌的核区不同,中心质 DNA 含量大,有些种类的 DNA 平均含量比高等动物细胞的含量还多,其量变动很大。同一种蓝藻的不同个体间也有差别。有人认为蓝藻的中心质具有"多倍染色体"的性质。

(2) 光合(作用)片层

光合片层是位于细胞质部分的同心环样的膜片层结构,上面规则地排列着直径约 35 nm 左右的小体,称为藻胆蛋白体,它由几种藻胆蛋白构成。藻胆蛋白包括藻蓝蛋白、异藻蓝蛋白(内含有藻蓝素)和藻红蛋白(内含有藻红素)3 类,藻胆蛋白分子均由 α、β 两个亚基构成,其上各带 1~4 个色素团。藻胆蛋白的作用是将光能传递给叶绿素 a,即:

光能→藻胆蛋白→叶绿素 a

因为蓝藻仅含叶绿素 a，而真核细胞含叶绿素 a、b，故蓝藻比高等植物的光合作用的效率要低，它属于一种原始的光合作用。蓝藻的光合作用又与某些具有光合作用的细菌不一样，蓝藻在进行光合作用时可放出氧气，而光合细菌则不能放出氧气。

(3) 细胞质内含物

蓝藻细胞质里含有许多各具特点的内含物，如蓝藻淀粉、脂滴、蓝藻颗粒体、多磷酸酯体、多角体等等。这些内含物各自有其特征性的细胞化学染色性能。在光镜与电镜下观察，形态各异，它们的形态与细胞的生理状态、细胞的发育、年龄和环境因素有关。它们中间有的是储存性的养料，有的代谢功能还不十分清楚。

(4) 细胞表面结构

蓝藻细胞膜外有细胞壁和一层胶质层。电镜观察可见细胞壁有 4 个结构层次，化学分析表明，蓝藻的细胞壁除了有和高等植物一样的纤维素成分外，还有与细菌相似的肽聚糖。有趣的是，有人发现有的蓝藻中这种物质的氨基酸组分比例类似于革兰氏阴性菌，说明蓝藻与细菌有着较密切的关系。细胞壁外的胶质层也称为鞘，易被碱性染料着色，其成分可能是酸性粘多糖和果胶质。鞘中有丰富的纤维丝状结构分布在不定形基质中，这些纤维的方向随种的不同而具有不同的特征性。鞘对于蓝藻抵抗不利环境很重要。

(5) 细胞分裂

蓝藻的藻体有单细胞体、群体和丝状体。它们的繁殖主要靠细胞分裂，分裂时细胞中部向内生长出新横隔壁，将中心质与原生质分为两半。一般情况下，两个子细胞在一个公共的胶质包围下保持在一起，并且不断进行分裂而形成多细胞的群体。

某些蓝藻（如念珠藻与项圈藻）的丝状群体细胞中存在与一般细胞不同的异胞体，异胞体非常脆弱，丝状细胞群体通过异胞体断裂而繁殖。异胞体还具有固氮的功能。

三、原核细胞与真核细胞的比较

我们介绍了原核细胞的知识以后，认为有必要将原核细胞与真核细胞（eukaryotic cell）进行概括性的比较。真核细胞与原核细胞最根本的区别可以归纳为两条：第一是细胞膜系统的分化与演变。真核细胞以膜系统的分化为基础，首先分化为两个独立的部分——核与质，细胞质内又以膜系统为基础分隔为结构更精细、功能更专一的单位——各种重要的细胞器。细胞内部结构与职能的分工是真核细胞区别于原核细胞的重要标志；第二是遗传信息量与遗传装置的扩增与复杂化。这与第一点相互密切联系，由于真核细胞结构与功能的复杂化，遗传信息量相应随之扩增，即编码结构蛋白与功能蛋白的基因数首先大大增多。遗传信息重复序列与染色体多倍性的出现是真核细胞区别于原核细胞的另

一重大标志。遗传信息的复制、转录与翻译的装置和程序也相应复杂化，真核细胞内遗传信息的转录与翻译有严格的阶段性与区域性，而在原核细胞内转录与翻译可同时进行，这也是两者区别的重要特征。

由于真核细胞内部结构与功能的复杂化，以及遗传信息量与遗传装置的扩增，真核细胞的体积就必然增大。总体来说，真核细胞的体积比起原核细胞要大得多。此外，真核细胞内有一个比较复杂的骨架系统，对维持细胞的形态结构，对细胞内部的一系列功能起着十分重要的作用，而在原核细胞内至今没有发现明显的骨架系统。

假如我们把真核细胞比作一个结构复杂、职能专一与"自动化"较高的"工厂"，那么原核细胞就像结构简单，但职能上却是"多面手的作坊"。前者比起后者固然有结构与功能专一和进化高级等特点，但在特定情况下它的适应能力却并不比原核细胞有特殊的优越性。

根据生物在地球表面分布的分析，可以看出原核生物比真核生物更能适应不利环境。几乎在地球的各个角落都有原核生物的存在，原核细胞的个体数量也远比真核生物多。根据细胞起源与进化的观点分析，原核细胞比真核细胞更为原始。早在 30 多亿年前，地球上就出现了原核细胞，而真核细胞仅在 12—16 亿年前才在地球上出现。现存的资料可以证明，真核细胞是由原核细胞进化而来，而且由于原核生物（主要是蓝藻）的繁衍，在地球表面积累了大量氧气，为真核细胞的起源与生存准备了条件。

我们将原核细胞与真核细胞的基本差异分两部分叙述。

1. 原核细胞与真核细胞结构与功能的比较

为了条理性，我们将原核细胞与真核细胞的基本特征差异列于表 2－2，但我们应更多思考它们的内在联系，更多地从进化的观点与动态的观点去分析它们的差异。以生物膜系统的分化与演变为基础，首先将细胞分化为核与质两个部分，双层核膜将遗传物质及其复制与转录过程局限在一个独立区域与微环境中，而蛋白质合成，能量代谢与供应，以及其他一系列代谢过程均在细胞质内进行。细胞质又进一步分化出结构与功能更专一的各种细胞器。建立在细胞内膜系统分化基础上的内部结构与功能的区域化与专一化，是细胞进化过程中的一次重大飞跃，导致了遗传装置的扩增与基因表达方式的相应变化。随着细胞体积的增大与细胞内部结构的复杂化，细胞内部要有空间上的合理布局，必然需要有一个精密的支架。细胞骨架可能主要担任了这个角色，这些支架网络保证了细胞形态结构的合理排布与执行功能的有序性。我们做这种逻辑上的推理，为的是把进化的观点、结构与功能相联系的观点引入到我们对细胞的认识中去。

2. 原核细胞与真核细胞遗传装置与基因表达方式的比较

遗传装置与基因表达的复杂化与多层次化是真核细胞不同于原核细胞的重大标志之一。双层核膜的出现为遗传物质结构的演化提供了一个良好的微环境，使大大扩增了的遗传信息与高度复杂的遗传装置相对地独立起来，使基因表达的程序具有严格的阶段性与区域性。

作为遗传信息载体的DNA也发生了结构与数量的相应变化，由原核细胞的单倍性变为多倍性。基因数量由几千发展到几万至十万以上，DNA由游离的裸露的环状分子转变为线状。线状DNA分子能与多种组蛋白结合，形成直径10 nm的核小体结构，以核小体为基本结构单位螺旋盘绕形成高度复杂的染色质与染色体。以上这些结构变化对遗传信息的稳定传递可能是有很大的优越性。结构上的复杂化使对真核细胞基因表达的调控转变为多层次性。

真核细胞基因表达及其调控方式明显区别于原核细胞，基因表达程序具有严格的时空关系，并具有多层次性的调控。原核细胞DNA含量有限，又要保证生命活动必要数量的基因，换言之，原核细胞必须充分利用仅有的DNA来充分存储必要的遗传信息，因此，原核细胞的基因结构必须"简洁"、有效，无多余序列。而真核细胞则不同，充分的遗传物质使它有足够的余地来形成各种特殊的基因结构，如内含子、重复序列、"无用"序列与假基因等等，它们出现的意义至今并不十分清楚，但无疑为复杂而多层次的基因表达调控提供了基础。在这些特征基因结构中很重要的一个就是内含子(intron)，它是基因中不编码的序列，与外显子(exon)相间形成结构基因，它的存在使真核细胞在基因上出现一个复杂的转录后mRNA加工过程，从而将真核细胞基因表达严格划分为细胞核内转录与细胞质内翻译两个过程。

表2-2　原核细胞与真核细胞基本特征的比较

特征	原核细胞	真核细胞
细胞膜	有(多功能性)	有
核膜	无	有
染色体	由一个环状DNA分子构成的单个染色体，DNA不与或很少与蛋白质结合	2个染色体以上，染色体由线状DNA与蛋白质结合组成
核仁	无	有
线粒体	无	有
内质网	无	有
高尔基体	无	有
溶酶体	无	有
核糖体	70*S*(包括50*S*与30*S*的大小亚单位)	80*S*(包括60*S*与40*S*的大小亚单位)
光合作用结构	蓝藻含有叶绿素a的膜层结构，细菌具有菌色素	植物叶绿体具有叶绿素a与b
核外DNA	细菌具有裸露的质粒DNA	线粒体DNA，叶绿体DNA
细胞壁	主要成分是氨基糖与壁酸	动物细胞无细胞壁，植物细胞壁的主要成分为纤维素与果胶
细胞骨架	无	有
细胞增殖(分裂)方式	无丝分裂(直接分裂)	以有丝分裂(间接分裂)为主

上述这些因素都促成了真核细胞能在转录前水平(如基因重排、基因扩增、DNA甲基化等)、转录水平(如增强子的促转录作用)、转录后水平(mRNA的拼接)以及翻译水平，翻译后水平(蛋白质分子修饰)等多种层次的调控。

与真核细胞相比较，原核细胞基因表达的调控则较简单，主要以操纵子模型

来叙述其调控特点，认为原核细胞是由几个相关的结构基因与操纵基因(operator)、启动基因(promotor)与Cap结合位点等协调合作，共同控制基因的表达，没有真核细胞那样复杂的调控层次。原核细胞的这种简单的调控方式能适应多种不利环境，进行快速调节。而真核细胞基因表达调节的复杂性与多层次性可能对遗传信息传递的严格性、修补能力与无误性更有利，从而保证了遗传信息传递的准确性和稳定性。

根据真核细胞与原核细胞在遗传装置、基因表达及其调控方面的区别，我们列一简表(表2-3)。

表2-3 原核细胞与真核细胞的遗传结构装置和基因表达的比较

特征	原核细胞	真核细胞
DNA量(信息量)	少	多
DNA分子数	1	2个以上
DNA分子结构	环状	线状
基因组数	1n	2n，多n
基因数	几千	大于几万，十万
大量"多余"的"重复"的DNA序列	-	+
基因中插入内含子	-	+
DNA与组蛋白结合	不或与少量类组蛋白结合	与5种组蛋白结合
DNA与组蛋白以核小体及各级高级结构构成染色质与染色体	-	+
DNA复制的明显周期性	-	+
基因表达的调控	主要以操纵子方式	复杂性，多层次性
转录与翻译的时空关系	转录与翻译同时同地进行	核内转录，细胞质内翻译严格的阶段性与区域性
转录后与翻译后大分子的加工与修饰	-	+
细胞复制与分裂(DNA传递与分配)	无丝分裂	有丝分裂，减数分裂

由于真核细胞遗传结构装置的复杂性、基因组的多倍性、染色体与染色质高级结构交替存在的形式、基因表达时空关系的严格性与区域性、基因表达调节的多层次性等等，使遗传物质的准确复制与均等无误地分配给子细胞增加了"难度"。加之真核细胞内部结构的庞大与复杂性，真核细胞的增殖方式变得比原核细胞繁杂与严格。真核细胞的增殖过程出现明显的周期性，细胞从一次分裂结束到下一次分裂结束称为细胞周期(cell cycle)。细胞周期可以明显地划分为两个阶段：细胞间期与细胞分裂期。细胞间期又可分为几个阶段，其中最显著的一个阶段叫S期，DNA在此期复制为原来的二倍，整个间期可看作是细胞增殖所需物质的合成期。为了准确无误地将遗传物质分配给两个子细胞，真核细胞的分裂期又可划分为几个阶段，分裂期最显著的特征是核膜的崩解，染色质转变为

染色体,出现有丝分裂器(mitotic apparatus),染色体均等分配给子细胞,子细胞核膜的重建。真核细胞的分裂因出现纺锤丝而称为有丝分裂(或间接分裂)。原核细胞的增殖也遵循遗传物质均等分配给子细胞的基本规律,但是没有明显的周期性,即没有真核细胞增殖过程的严格阶段,也不出现上述形态与结构上截然的界限,没有染色质与染色体结构的交替,更无有丝分裂器——纺锤体的出现,所以将原核细胞的分裂叫做无丝分裂或直接分裂。

四、古核细胞(古细菌)

古核生物(archaeon)或称古细菌(archaebacteria)是20世纪80年代出现的名称。古细菌(又称原细菌)是一些生长在极端特殊环境中的细菌,过去把它们归属为原核生物是因为其形态结构、DNA结构及其基本生命活动方式与原核细胞相似。最早发现的是产甲烷细菌类,根据其16*S* rRNA核苷酸序列的同源性测定分析,它与其他原核细胞相差甚远;而其16*S* rRNA序列分析和其他一些分子生物学特征却与真核细胞更为近似。后来陆续又发现其他的古细菌,如盐细菌(halobacteria,生长在浓度大的盐水中)、热原质体(thermoplasma,生长在煤堆中)、硫氧化菌(sulfolobus,生长在硫磺温泉中)。现在已发现100多种古细菌,并将它们分类为目、科、属、种。古细菌是与人类生活关系不大的一类原核生物,尤其是因为他们生存在极度特殊的,非一般生物能生存的高温或高盐的环境中,长期不为人们所重视。近十多年来,随着进化分子生物学与进化细胞生物学的兴起,特别是发现在海洋深处的热泉口很高温的环境中存在的众多嗜热细菌,人们很自然联想到这些古细菌与地球早期生命环境的关系,设想它们可能在细胞起源与进化中扮演过重要角色,因此古核生物引起了越来越多学者的重视。对古核生物有很多根本性的问题值得研究:诸如古核细胞的结构功能特点及其嗜热嗜盐的特性,它们与真细菌和真核细胞在进化上的关系等等,现在已有更多的论据说明真核生物可能是起源于古核生物。

1996年,对古核生物产甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)基因组全序列的测定已完成,为研究古核生物的分子进化奠定了良好的基础。古核细胞没有核膜,其基因组结构为一环状DNA,常常含有操纵子结构,因此人们长期认为古核细胞的遗传结构装置更近似原核细胞,把它们归属于原核细胞的一类,然而近年的研究说明并非如此。

下面我们列举一些古核细胞与真核细胞相似性的资料,说明古细菌比真细菌更可能是真核细胞的祖先,或者可以说明古核细胞与真核细胞曾在进化上有过共同历程。

(1) 细胞壁的成分

真细菌的壁主要由含壁酸的肽聚糖构成,古细菌也有细胞壁,但其成分却与真核细胞一样完全不含上述成分,因此抑制壁酸合成的链霉素,抑制肽聚糖前体合成的环丝氨酸,抑制肽聚糖合成的青霉素与万古霉素等对真细菌类有强的抑

制生长作用,而对古细菌与真核细胞却无作用。

(2) DNA 与基因结构

真核细胞的 DNA 中含有大量的重复序列,真细菌类的细胞 DNA 不含重复序列,而古核细胞 DNA 中却有重复序列的存在。此外,多数古核细胞的基因组中像真核细胞一样存在内含子,而真细菌中是不存在内含子的。

(3) 核小体结构

古核细胞具有组蛋白,而且能与 DNA 构建成类似核小体的结构,但与真核细胞典型核小体有差异。

(4) 核糖体

众所周知,真核细胞的核糖体为 80S,含有 70~84 种蛋白;大部分真细菌的核糖体为 70S,含有 55 种蛋白;而多数古细菌类的核糖体较真细菌有增大趋势,含有 60 种以上蛋白,介子真核细胞与真细菌之间。我们知道,一系列抗生素的抑制作用主要是通过它们与细菌核糖体的大或小亚单位的结合,从而抑制蛋白质合成的某些环节,达到抑制蛋白质的合成,最终达到抑制细菌的作用。抗生素的这种作用机理不仅对细菌有效,对所有真细菌的原核细胞都有同样效应。然而这些抗生素都不能与真核细胞 80S 核糖体结合而起到对真核细胞蛋白质合成的抑制作用。令人惊异的是,以上这些抗生素同样不能抑制古核细胞类的核糖体的蛋白质合成。综上所述,古核细胞的核糖体显然与真细菌的差异很大,从对抗生素的反应看,应更类似真核细胞的核糖体。

(5) 5S rRNA

近 10 多年来,根据对 5S rRNA 序列的分析,在鉴定物种进化亲缘关系方面做了很多可贵的工作。因为古核细胞、真细菌与真核细胞都有 5S rRNA,它们仅含约 120 个核苷酸。Husysman 与 Wachter(1986)根据对 5S rRNA 的分子进化分析,认为古细菌与真核生物同属一类,而真细菌却与之差距甚远。5S rRNA 二级结构的研究也说明很多古细菌与真核生物相似。

除上述各点外,根据 DNA 聚合酶分析,氨基酰 tRNA 合成酶的作用分析,起始氨基酰 tRNA 与肽链延长因子等分析,也提供了以上类似依据,说明古细菌与真核生物在进化上的关系较真细菌类更为密切。因此近年来,真核细胞起源于古核细胞的观点得到了加强。

真核细胞究竟起源于哪一类古细菌,现在有两种推测:一种推测认为起源于一种依赖于硫的嗜高温古核细胞;另一种推测认为起源于与热原质体相似的古核细胞。这些只是根据某些更相似的特征而推论,还缺少更多的具有说服力的科学论据。

第四节 真核细胞基本知识概要

前面我们已经将原核细胞与真核细胞做了比较,真核细胞是遗传信息量大、结构相对复杂的细胞,原始真核细胞大约在 12—16 亿年前在地球上出现。近年

来研究表明,真核细胞的起源和古核细胞的关系更密切。现存的真核细胞种类繁多,有些真核细胞极为原始,如涡鞭毛虫(甲藻)等,还保存着原核细胞与真核细胞的一些交叉特征。真核细胞既包括大量的单细胞生物或原生生物(如原生动物与一些单细胞藻类),又包括全部多细胞生物(一切动植物)的细胞。凡是真核细胞构成的有机体现在统称为真核生物。本节仅就真核细胞的最基本知识作概要介绍,有关真核细胞的结构与功能,以及重要生命活动将在本书中有关的章节进行介绍。

一、真核细胞的基本结构体系

真核细胞是以生物膜的进一步分化为基础,使细胞内部构建成许多更为精细的具有专门功能的结构单位。真核细胞虽然结构复杂,但是可以在亚显微结构水平上划分为三大基本结构体系:① 以脂质及蛋白质成分为基础的生物膜结构系统;② 以核酸(DNA 或 RNA)与蛋白质为主要成分的遗传信息表达系统;③ 由特异蛋白分子装配构成的细胞骨架系统。这些由生物大分子构成的基本结构体系,均是在 5~20 nm 较为稳定的范围之内。这三种基本结构体系构成了细胞内部结构精密、分工明确、职能专一的各种细胞器,并以此为基础而保证了细胞生命活动具有高度程序化与高度自控性。也可以以这三种结构为基础而粗略地划分为几种功能体系。

(一) 生物膜系统

以细胞的生物膜系统为基础形成了各种独立的、重要的细胞器。膜的厚度基本在 8~10 nm 范围之内。构成各种细胞器的膜的功能有一定的共同性,即保证物质的交换与跨膜运输,信息与能量的传递和化学反应的进行。生物膜为生命的化学反应提供了表面,绝大多数酶定位在膜上,绝大部分生化反应在膜的表面进行。

细胞表面是指细胞膜及其相关结构,其主要功能是进行选择性的物质交换与跨膜运输,并有能量转换、识别、运动、粘附与对外界信号的接收和放大等作用。细胞内部由双层核膜将细胞分成两大结构与功能区域——细胞质与细胞核,绝大多数细胞的核与质的体积有一定的比例关系。在细胞质内以膜的分化为基础形成很多重要的细胞器。线粒体与叶绿体主要供应细胞生命活动所需要的能量,它们均为双膜封闭结构,称为产能细胞器;内质网是生物分子合成的基地,脂质、糖类与很多蛋白分子是在内质网表面合成并分选运输;高尔基体是合成物加工、包装与运输的细胞器;溶酶体是细胞内的消化系统。以上这些细胞器都是由生物膜构建成的封闭结构。

(二) 遗传信息表达结构系统

由 DNA - 蛋白质与 RNA - 蛋白质复合体形成的遗传信息载体与表达系统,一般是以颗粒状与纤维状的基础结构(直径在 10~20 nm 范围),构建成执行细胞的遗传信息储存与复制、核酸转录与蛋白质翻译的体系。

染色质由 DNA 与蛋白质(主要是组蛋白与种类繁多的非组蛋白)构成，DNA 复制与 RNA 转录都在染色质上进行。首先由 DNA 与组蛋白构成了染色质与染色体的基本结构——核小体(nucleosome)，它们的直径为 10 nm，然后由核小体盘绕、折叠成螺旋化程度不同的异染色质与常染色质，在细胞分裂阶段又进一步包装而形成染色体。

核仁主要是由 RNA - 蛋白质与 DNA - 蛋白质组成，其主要功能是 rRNA 的转录与核糖体亚单位的装配。核仁分为丝状区与颗粒区两部分，丝状区包含大量直径为 5～10 nm 的纤维与颗粒，纤维盘绕成核仁丝。纤维主要是 RNA - 蛋白质丝，其中也含有 DNA - 蛋白质丝(称为核仁染色质)。核仁 DNA 主要为 rDNA，是转录 rRNA 的模板；核仁颗粒区是由大量直径为 15～22 nm 的颗粒组成，实际上是核糖体亚单位的前体，由 rRNA 与蛋白质组成。

核糖体是由 rRNA 与数十种蛋白质构成的颗粒结构，其沉降系数为 80S，直径为 15～25 nm，是合成蛋白质的细胞器，其功能是将氨基酸根据 mRNA 的指令按一定序列合成肽链。

(三) 细胞骨架系统

细胞的骨架系统是由一系列特异的结构蛋白装配而成的网架系统，细胞骨架对细胞形态与内部结构的合理排布起支架作用，细胞内大分子的运输，细胞的运动与细胞器的位移，细胞信息的传递、基因表达、蛋白合成，细胞的分裂与分化等重要的生命活动都与细胞骨架关系密切。细胞骨架体系在细胞结构与生命活动中具有全方位的意义，因此我们认为将其与生物膜体系和遗传信息表达体系并列为真核细胞的三大结构体系是合理的。

细胞骨架可分为胞质骨架与核骨架，实际上它们又是相互联系的。胞质骨架主要是由微丝、微管与中等纤维等构成的网络体系。微丝的主要成分是肌动蛋白，故又称肌动蛋白丝，直径 5～7 nm，它的主要功能可能是信号传递与运动。微管的主要成分是管蛋白与一些微管结合蛋白，直径为 24 nm，其主要功能是对细胞结构起支架作用，对大分子与颗粒结构起运输作用。中等纤维成分比较复杂，可分为多种类型，其蛋白成分的表达与细胞分化关系极为密切。中等纤维的直径为 10 nm，目前对中等纤维的功能还知之甚少。核骨架的研究在近十多年内才有较快的发展，广义的核骨架应包括核纤层(nuclear lamina)与核基质(nudear matrix)两个部分。核纤层的成分是核纤层蛋白(lamin)，核基质的蛋白成分则颇为复杂。现已发现，核骨架与基因表达、染色质构建与排布有关系。关于细胞骨架体系的知识在第十章有专门的叙述，在此仅作简要的引论。

从上述三种基本结构体系的分析，我们可以在亚显微尺度上找到一个基本共同点：不论是生物膜的厚度，遗传信息表达体系颗粒与纤维结构的大小，还是骨架纤维的直径都是在 5～20 nm 的尺度范围。为什么构成细胞基本结构体系的基础生物大分子的聚合体，诸如脂质与蛋白质分子复合体，核酸 - 蛋白质分子复合体，或蛋白分子复合体的大小尺度都是在一个特定的范围？这使我们回想起原苏联著名科学家 G. Frank 在 20 世纪 50 年代末曾说过的话：生命的奥妙可

能缊含在 5～50 nm 的大分子复合体中。近 30 多年来，生物结构的研究由亚显微水平到分子水平各层次的深入，说明当时这一推测性的论点是富有较深哲理的。近年，所谓纳米生物学(nanobiology)——在纳米尺度上的生物分子结构的研究，可能为在更深层次上揭示三种基本结构体系的大分子复合体，在纳米几何尺度上的构建及其与功能的关系提供更有力的证据。

二、细胞的大小及其分析

关于各类细胞直径的大小，为便于记忆，我们编制了一个简表(表 2－4)，从中可以找出一些规律。按细胞平均直径粗略计算，支原体细胞比最小的病毒大 10 倍，细菌细胞比支原体大 10 倍，而多数动植物细胞又比细菌大 10 多倍，一些原生动物细胞又比一般动植物细胞大 10 倍，当然也有很多例外。

表 2－4　各类细胞直径的比较

细胞类型	直径大小/μm
最小的病毒	0.02
支原体细胞	0.1～0.3
细菌细胞	1～2
动植物细胞	20～30(10～50)
原生动物细胞	数百至数千

高等动植物组织的细胞大小多数处于一个很狭窄的范围，其直径为 20～30μm(幅度为 10～100μm)。当然亦有很多例外，如卵细胞就特别大，鸵鸟卵细胞直径为 5 cm，鸡卵细胞 2～3 cm，人卵细胞 200μm；有些神经细胞可长达 1 m，但其直径不超过 100μm；小型白细胞只有 3～4μm，人的红细胞为 7μm。植物细胞在分裂以后，随着细胞的发育与分化，有一个明显的细胞体积增长过程，分生组织的细胞较小，分化的细胞较大。

分析高等动植物细胞的大小，可以发现这样的规律：不论其种的差异多大，同一器官与组织的细胞，其大小更倾向于在一个恒定的范围之内。大象与小鼠的体型大小相差十分悬殊，但大象与小鼠相应器官与组织的细胞，其大小却无明显差异，不仅相应的体细胞大小相似，性细胞的大小也无明显的差异。又如所有哺乳动物的肾细胞、肝细胞或其他细胞，在人、牛、马、象与小鼠的相应细胞的大小几乎相同。因此器官的大小主要决定于细胞的数量，与细胞的数量成正比，而与细胞的大小无关，这种关系有人称之为"细胞体积的守恒定律"。我们认为细胞体积的守恒规律可以与细胞是生命活动基本单位的概念联系起来理解。

我们在介绍最小的细胞——支原体细胞时曾谈到细胞体积的最小极限。那么细胞最大体积的极限与什么因素有关？细胞的体积受什么因素控制？我们认为可以由三个方面进行探讨：

1. 细胞的体积与相对表面积成反比关系，细胞体积越大，其相对表面积就越小，细胞与周围环境交换物质的效力就越小。有些细胞为了增加表面积，就形

成很多的细胞突起。卵细胞一般与外界交换物质较少，故表面积与体积的比例关系不受此规律的限制。

2. 有一种较为普遍的现象，不论细胞体积大小相差多大，但各种细胞核的大小悬殊却不大。我们知道，一个细胞核内所含的遗传信息量是有一定限度的，能控制细胞质的活动也是有限度的，因此一个核能控制细胞质的量也必有一定限度，细胞质的体积不能无限增大。在体积较大的原生动物细胞中出现大核与小核的分工，以及动物细胞的多核现象是否与缓冲核质比例有关呢？是值得探讨的。

3. 细胞内物质的交流运输与细胞体积的关系。细胞内的物质从一端向另一端运输或扩散是有时间与空间关系的，假如细胞的体积很大，势必影响物质传递与交流的速度，细胞内部的生命活动就不能灵敏地调控与缓冲。有一些原生动物细胞的伸缩泡等可能起着细胞内环境的调节作用。

由于上述种种因素的影响，细胞作为生命活动的基本单位，其体积必然要适应其代谢活动的要求，应有一定的限度，因此数百微米直径的细胞应被认为是上限了。卵细胞之所以不受此限制，是因为早期胚胎发育是受储存在卵细胞质内的 mRNA 与功能蛋白调控的，并利用预先储存在卵细胞质内的养料，因此在细胞质内储存了大量 mRNA、蛋白质与养料，同时卵细胞与周围环境交换物质很少，卵细胞的体积大主要因胞质扩增所致。

三、细胞形态结构与功能的关系

细胞的形态结构与功能的相关性与一致性是很多细胞的共同特点，在分化程度较高的细胞更为明显。这是生物漫长进化过程的产物，从进化观点看有一定的合理性。

首先以哺乳动物红细胞为例来分析一下。红细胞呈扁圆形、体积很小，是一种非常特化的细胞。哺乳动物的红细胞内无核，亦无其他重要细胞器，主要是由细胞膜包着血红蛋白。这些特点都与红细胞交换 O_2 与 CO_2 的功能密切相关。细胞体积小、呈圆形，非常有利于在血管内快速运行，体积小则相对表面积大，有利于提高气体交换效率。细胞内主要是血红蛋白，有助于结合更多的 O_2 与 CO_2。因此，红细胞的形态和结构装置与其交换气体的功能的关系是非常合理的。

又如动物的各类分泌细胞，虽然分泌物的性质不同，但其形态结构却有共同性。例如，分泌蛋白质性质的各种腺细胞，其形态与结构必然有如下的特点：细胞一定呈极性，一端是近侧端，为吸收表面，与基膜(basal lamina)连接；另一端是游离端，是分泌表面。吸收表面的细胞膜必然形成大量的皱褶，并在褶叠膜内排列有大量的线粒体，因为这均有助于增加物质透膜运输的效率及能量供应。游离端往往形成很多微绒毛，增加表面积，以提高分泌效率。细胞质内的内质网与高尔基体必然很发达，因为要保证蛋白质高速度的合成与加工，供能的细胞器——线粒体的数量必然较多，而且分布在内质网附近。核仁的体积一般较大，因

为要保证生产足够的核糖体(蛋白质合成的机器)。

雄性生殖细胞与雌性生殖细胞经过分化与发育,形成非常特化的细胞,它们的结构装置几乎简化到仅只有利于完成受精过程与保证卵裂。精子除了携带一套完整的单倍基因组,即高度的浓缩核外,其他结构装置主要保证其运动与进入卵内。即后端具有能运动的鞭毛,前端具有有助于进入卵的顶体(类似大溶酶体)。卵细胞则相反,为了保证受精后卵裂与早期胚胎发育,它必须在胞质内预先储存大量的 mRNA、蛋白质与养料,致使细胞体积骤增,但其细胞核的体积并没有明显变化。

虽然以上叙述的是一些特化的动物细胞的结构与功能的关系,但绝大多数动物与植物细胞是遵循结构与功能相一致这一规律的。

四、植物细胞与动物细胞的比较

构成动物与植物机体的细胞均有基本相同的结构体系与功能体系。很多重要的细胞器与细胞结构,如细胞膜、核膜、染色质、核仁、线粒体、高尔基体、内质网与核糖体、微管与微丝等等,在不同细胞中不仅其形态结构与成分相同,功能也一样。近年在植物细胞内也发现了类似动物细胞的中等纤维与溶酶体的结构,植物细胞的圆球体与糊粉粒具有类似溶酶体的功能(图 2－6,图 2－7)。

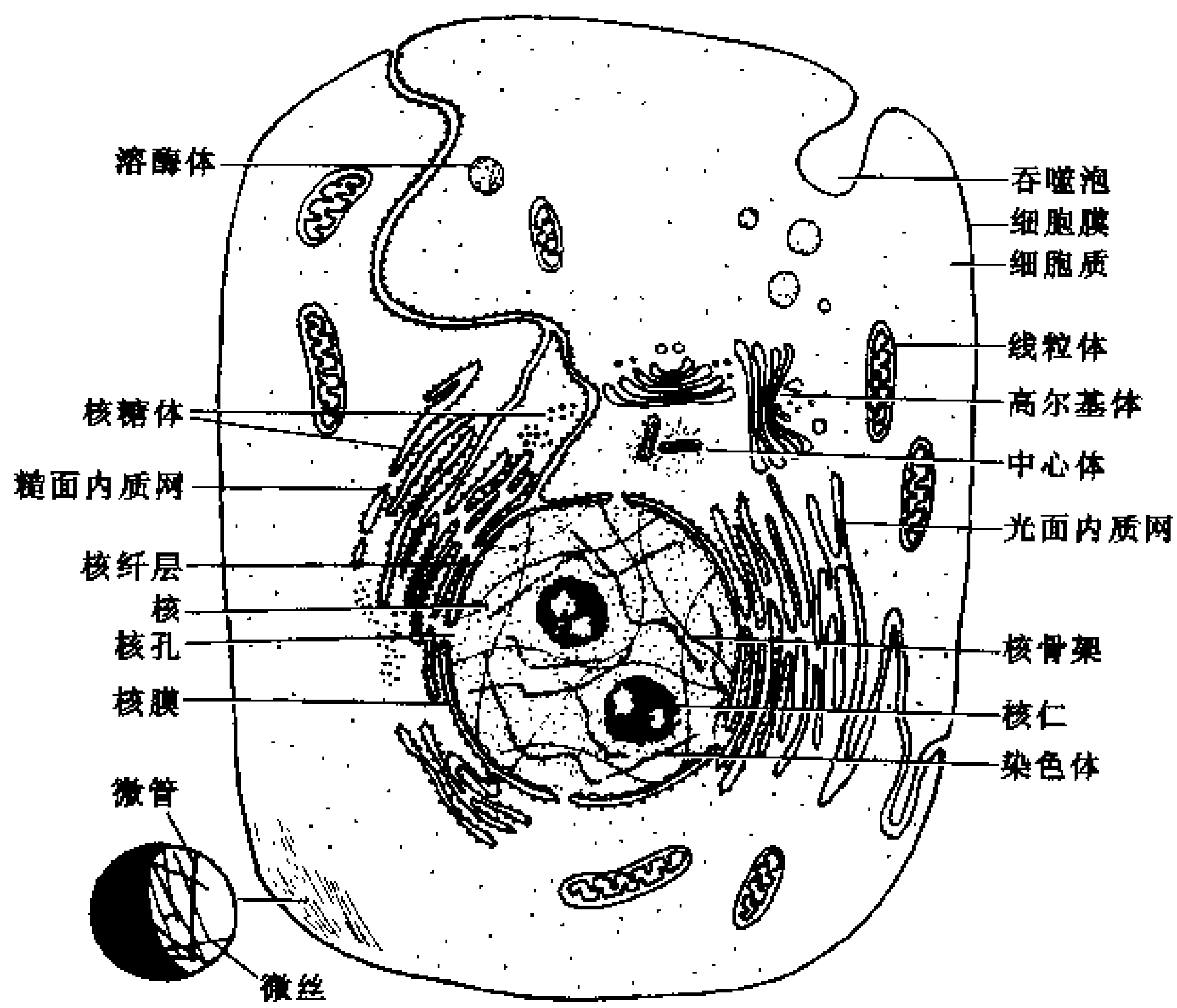


图 2－6　动物细胞模式图

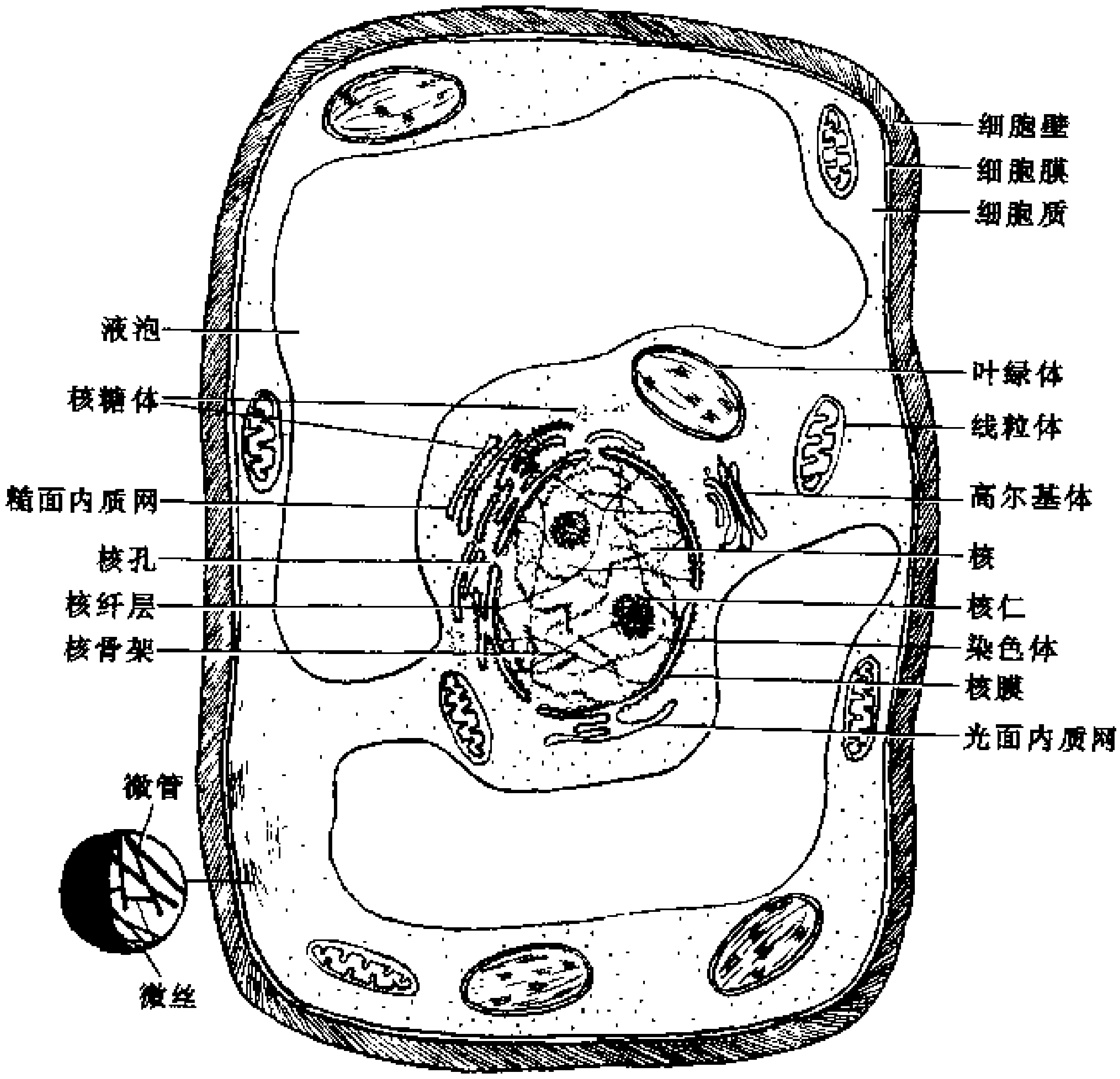


图 2－7 植物细胞模式图

植物细胞却有一些动物细胞所没有的特有的细胞结构与细胞器，如细胞壁、液泡与叶绿体及其他质体。植物细胞在有丝分裂以后，普遍有一个体积增大与成熟的过程，这一点比动物细胞表现明显。在这一过程中，细胞的结构要经历一个发育的阶段，如细胞壁的初生壁与次生壁的形成，液泡的形成与增大，有色体的发育等。也有一些动物细胞的结构，如中心体，是植物细胞内不常见到的。下面我们简单介绍一下植物细胞所特有的细胞器。

（1）细胞壁

细胞壁是在细胞分裂过程中形成的，先在分裂细胞之间形成胞间层，其主要成分是果胶质，再在胞间层与质膜之间形成有弹性的初生壁（1～3μm），有些细胞还形成坚硬的次生壁（5～10μm）。细胞壁的主要成分是纤维素，还有果胶质、半纤维素与木质素等。植物细胞壁产生了地球上最多的天然聚合物：木材、纸与布的纤维。细胞壁的某些部位有间隙，原生质可以由此沟通，形成胞间连丝。

（2）液泡

液泡是植物细胞的代谢库，起调节细胞内环境的作用。它是由脂蛋白膜包围的封闭系统，内部是水溶液，溶有盐、糖与色素等物质，溶液的浓度可以达到很高的程度。液泡随着细胞的生长，可由小液泡合并与增大而成为大液泡。液泡

的另一功能可能具有压力渗透计(osmometer)的作用，使细胞保持膨胀状态。

(3) 叶绿体

叶绿体是植物细胞内最重要、最普遍的质体，它是进行光合作用的细胞器。叶绿体利用其叶绿素将光能转变为化学能，把 CO_2 与水转变为糖。叶绿体是世界上成本最低、创造物质财富最多的“生物工厂”。

提　要

细胞是一切生命活动的基本单位，包括以下几个方面的涵义：① 一切有机体都由细胞构成，细胞是构成有机体的形态结构单位。构成多细胞生物体的细胞虽然是“社会化”的细胞，但它们又保持着形态结构的独立性，每一个细胞具有自己完整的结构体系。② 细胞是有机体代谢与执行功能的基本单位，在细胞内的一切生化过程与试管内的生化过程根本不同点，是细胞有严格自动控制的代谢体系，并且有保证完成生命过程有序性的独立的结构装置。③ 有机体的生长与发育是依靠细胞增殖、分化与凋亡来实现的。细胞是研究有机体生长与发育的基础。④ 细胞是遗传的基本单位，每一个细胞都具有遗传的全能性(除少数特化细胞)。构成各种生物机体的细胞的种类繁多，结构与功能各异，但它们都具有基本共性：细胞膜，两种核酸(DNA 与 RNA)，蛋白质合成的机器——核糖体与一分为二的增殖方式，这些是细胞结构与生存不可缺少的基础。病毒是非细胞形态的生命体，但所有的病毒，必须在细胞内才能表现它们的基本生命活动——复制(增殖)。病毒是最小最简单的生命体，主要是由一个核酸分子(DNA 或 RNA)与蛋白质构成的复合结构，类病毒仅由一条有感染性的 RNA 构成。病毒在细胞内的复制(增殖)过程大致可分为：侵染、脱壳体、早基因复制与表达、晚基因复制、结构蛋白合成、装配与释放等过程。

种类繁多的细胞可以分为原核细胞与真核细胞两大类。近年认为原核细胞并不是统一的一大类，建议将细胞划分为原核细胞、古核细胞与真核细胞三大类。支原体是迄今发现的最小最简单的细胞，它却已具备细胞的基本结构，并且有作为生命活动基本单位存在的主要特征。比支原体更小更简单的细胞，又要维持细胞生命活动的基本要求，似乎不大可能。

细菌与蓝藻是原核细胞的两个重要代表。原核细胞的共同特征为：没有核膜，遗传信息载体仅仅是一个裸露的环状 DNA 分子，除核糖体与细胞膜及其特化结构外，几乎不存在其他复杂的细胞器。将原核细胞与真核细胞进行比较，从进化与动态的观点分析，主要有两个基本差异：一是以生物膜系统的分化与演变为基础，真核细胞形成了复杂的内膜系统，构建成各种具有独立功能的细胞器，双层核膜将细胞分隔为核与质两个基本部分；二是遗传结构装置的扩增与基因表达方式的相应变化。由于上述的根本差异，真核细胞的体积也相应增大，内部结构更趋复杂化，生命活动的时间与空间的布局更为严格，细胞内部出现精密的网架结构——细胞骨架。

古核细胞的形态结构、遗传装置虽与原核细胞相似,但一些基本分子生物学特点又与真核细胞接近。

本章最后对真核细胞的基本知识进行了概述。真核细胞的结构可以概括为三大体系:① 生物膜体系以及以生物膜为基础构建的各种独立的细胞器;② 遗传信息表达的结构体系;③ 细胞骨架体系。此外,细胞体积的守恒规律及其制约因素的分析,细胞的形态结构和功能的相关性与一致性,动植物细胞的差异等均是真核细胞知识的重要组成部分。

思 考 题

1. 根据你所掌握的知识,如何理解"细胞是生命活动的基本单位"这一概念?

2. 病毒是非细胞形态的生命体,又是最简单的生命体,请论证一下它与细胞不可分割的关系。

3. 为什么说支原体可能是最小最简单的细胞存在形式?

4. 请你在阅读了本章以后对原核细胞与真核细胞的比较提出新的补充。

5. 细胞的结构与功能的相关性观点是学习细胞生物学的重要原则之一,你是否能提出一些更有说服力的论据来说明这一问题。

参 考 文 献

1. 郑国锠. 细胞生物学(第二版). 北京:高等教育出版社,1992

2. 汪堃仁,薛绍白,杨惠图. 细胞生物学(第二版). 北京:北京师范大学出版社,1998

3. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: concepts and experiments, 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999

4. Bruce Alberts et al., Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing Inc., 1998

第三章

细胞生物学研究方法

如同生物学其他分支学科一样，技术的进步在细胞生物学的建立与发展中起着巨大的作用。没有显微镜的发明就不会提出细胞学说；同样，如果没有电子显微镜技术及其与分子生物学技术相结合，很难想象细胞生物学会有像今天这样的长足进展。那么，哪些技术属于细胞生物学研究方法的范畴呢？一般来说，凡是用来解决细胞生物学问题所采用的方法都应属于细胞生物学研究方法。然而，当今几乎没有哪些生物学问题与细胞和细胞生物学无关。显然，本章很难将所有的细胞生物学研究方法在这里一一介绍。

从另一方面来看，人们的认识过程固然是从个体—细胞—分子水平逐渐深入，然而从生命的层次或生命的起源与进化角度来看，则是由生物大分子—细胞—多细胞有机体逐渐发展起来。因此，对细胞生物大分子的成分与功能的分析乃是了解细胞结构与细胞生命活动的基础。因此，当今细胞生物学研究中也常常使用这些实验方法，如核酸与蛋白成分的分析和序列测定，研究特异 DNA、RNA 片段和特异蛋白所常用的 Southern 杂交、Northern 杂交和蛋白免疫印迹技术、基因的克隆与表达等，用于研究蛋白之间相互作用的双杂交技术，分析细胞特异表达基因的 DNA 消减杂交技术以及研究某一特定基因功能的基因剔除技术等。而这些技术在生物化学、分子生物学和其他学科中已有介绍，因此，无需在这里赘述。考虑到细胞生物学的学科特点、发展历史及当前所研究的内容，本章拟从细胞的形态观察、细胞组分的分析与原位检测及细胞培养等几个方面介绍有关细胞生物学研究方法，侧重于实验方法的基本原理及所能解决的问题，具体的操作步骤详见本章参考书。

第一节　细胞形态结构的观察方法

借助显微镜扩大了人们的视野。肉眼的分辨率一般只有 0.2 mm，光学显微镜的分辨率为 0.2 μm，而电子显微镜可达 0.2 nm，图 3－1 比较了不同细胞的大小与光学显微镜、电子显微镜、扫描隧道显微镜的分辨率范围。

一、光学显微镜技术

光学显微镜技术(light microscopy)曾经在细胞学研究中发挥了重要作用。不仅如此,细胞生物学工作者至今仍然离不开普通的光学显微镜,并且随着多种现代生物学技术与光镜技术的结合,使光学显微镜展示出了新的活力。

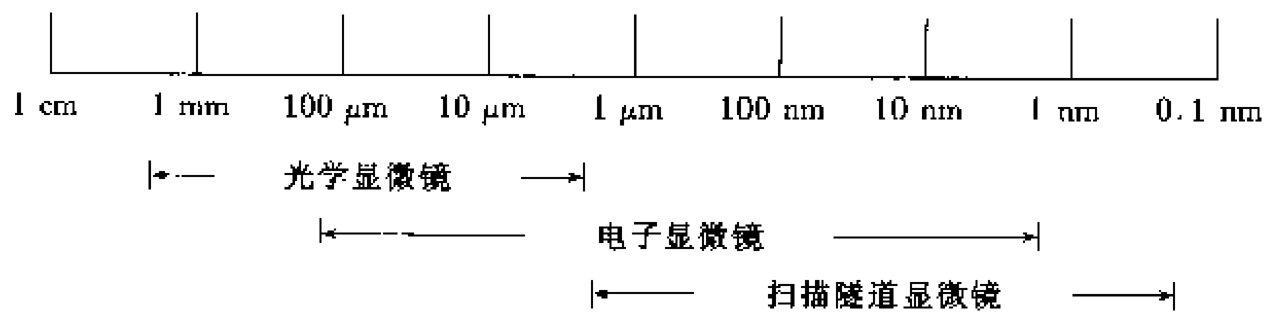


图 3-1　各种细胞及其组分的大小在对数刻度尺上的分布图及几种显微镜的分辨范围

(一) 普通复式光学显微镜技术

光学显微镜的组成主要分三部分:① 光学放大系统,为两组玻璃透镜:目镜与物镜;② 照明系统:光源、折光镜和聚光镜,有时另加各种滤光片以控制光的波长范围;③ 机械和支架系统,主要是保证光学系统的准确配制和灵活调控。对任何显微镜来说,最重要的性能参数是分辨率,而不是放大倍数。分辨率是指区分开两个质点间的最小距离。这两个质点之间的距离取决于光源波长 λ,物镜镜口角 α(标本在光轴的一点对物镜镜口的张角)和介质折射率 N,它们之间的关系是:

$$D=\frac{0.61\ \lambda}{N\cdot\sin\ \alpha/2}$$

通常 α 最大值可达 140°,空气中 $N=1$,最短的可见光波长 $\lambda=450$ nm,此时分辨率 $D=292$ nm,约 0.3μm。若在油镜下,N 可提高到 1.5,D 则可达 0.2 μm,所以普通光镜的最大分辨率是 0.2 μm。

普通光镜样品的制备通常是将样品经过固定剂(如甲醛等)固定后,包埋到包埋剂(如石蜡等)中,然后切成厚约 5 μm 的薄切片以便观察。样品在观察前一般要经过染色,不同的染料对某种细胞组分有特异的吸附,这样便能形成足够的反差或产生不同波长的光谱以区分该种细胞组分。如伊红和美蓝能特异性地与不同蛋白质结合,而品红则能特异性地显示出 DNA 的所在部位。

(二) 荧光显微镜技术

荧光显微镜技术(fluorescence microscopy)也许是目前在光镜水平对特异蛋白质等生物大分子定性定位的最有力的工具。荧光显微镜技术包括免疫荧光技术(见本章第二节)和荧光素直接标记技术。例如将标记荧光素的纯化肌动蛋白显微注射入培养细胞中,可以看到肌动蛋白分子装配成肌动蛋白纤维。将可产

生荧光的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein ,GFP)基因与某种蛋白基因融合,在表达这种融合蛋白的细胞中,便可直接观察到该蛋白的动态变化。

不同荧光素的激发光波长范围不同,所以同一样品可以同时用两种以上的荧光素标记。标记荧光素的样品在荧光显微镜下经过不同波长的激发光激发,可发射出不同颜色的荧光。荧光显微镜中只有激发荧光可以成像,因为产生激发光的光全被样品与照相机之间的滤光片吸收了。

(三) 激光共焦点扫描显微镜技术

普通荧光显微镜下,许多来自焦平面以外的荧光使观察到的图像反差和分辨率降低,而激光共焦点扫描显微镜(laser scanning confocal microscopy) 则大大减少了这种焦平面以外的光,它在某一瞬间只用很小一部分光照明,这一束光通过检测器前的一个小孔或裂缝后成像,保证只有来自该焦平面的光成像,而来自焦平面以外的散射光则被小孔或裂缝挡住(图 3－2)。这样所成的像异常清晰,激光共焦点扫描显微镜的分辨率可以比普通荧光显微镜的分辨率提高 1.4～1.7 倍。所谓共焦点是指物镜和聚光镜同时聚焦到同一个小点,即它们互相共焦点。激光共焦点扫描显微镜比普通显微镜有诸多好处。由于可自动改变观察的焦平面面且纵向分辨率(axial resolution)得到改善,所以可以通过“光学切片”观察较厚样品的内部结构。将改变焦点获得一系列细胞不同切面上的图像,经叠加后便可重构出样品的三维结构。激光共焦点扫描显微镜在研究亚细胞结构与组分等方面的应用越来越广泛。

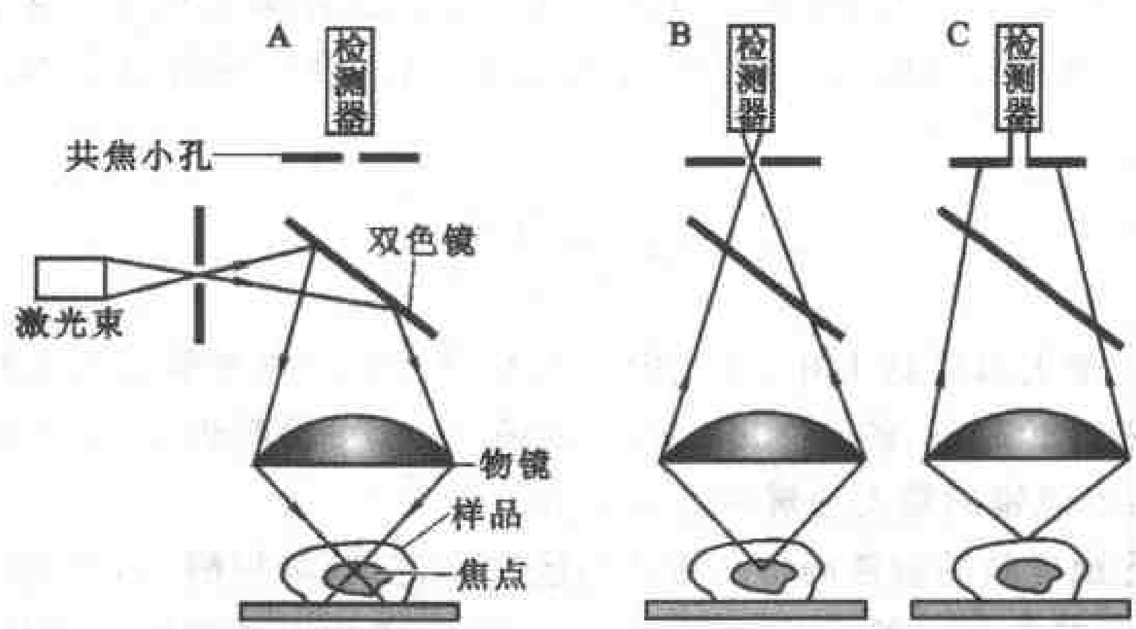


图 3－2　激光共焦点扫描显微镜的原理图

A:激光束(光源)经双色镜反射后,通过物镜汇聚到样品某一焦点;B:从焦点发射的荧光(样品一般经免疫荧光标记)经透镜汇聚成像,被检测器检出;C:通过样品其他部位的激光即激光发出的荧光不会聚焦成像,因而检测器不能检出

(四) 相差和微分干涉显微镜技术

光线通过不同密度的物质时,其滞留程度也不同。密度大则光的滞留时间长,密度小则滞留时间短。所以,在相差显微镜(phase-contrast microscope)中,可将这种光程差或相位差,转换成振幅差。相差显微镜与普通光学显微镜最主要

的不同点是在物镜后装有一块“相差板”，偏转的光线分别通过相差板的不同区域，由于相差板上部分区域有吸光物质，所以又使两组光线之间增添了新的光程差，从而对样品不同密度造成的相位差起“夸大”作用。最后这两组光线经过透镜又会聚成一束，发生互相叠加或抵消的干涉现象，从而表现出肉眼明显可见的明暗区别。由于反差是以样品中的密度差别为基础形成的，故相差显微镜的样品不需染色，可以观察活细胞，甚至研究细胞核、线粒体等细胞器的动态。

微分干涉显微镜(differential－interference microscope)用的是平面偏振光。这些光经棱镜折射后分成两束，在不同时间经过样品的相邻部位，然后再经过另一棱镜将这两束光汇合，从而样品中厚度上的微小区别就会转化成明暗区别，增加了样品反差并且具有很强的立体感。微分干涉显微镜更适于研究活细胞中较大的细胞器。将微分干涉显微镜接上录像机，可以观察活细胞中的颗粒及细胞器的运动。

用计算机辅助的微分干涉显微镜可以得到很高的反差，使一些精细结构如单根微管等也可以在光镜下分辨出来。其分辨率比普通光镜提高了一个数量级，这不仅填充了普通光镜与电镜之间分辨范围上的间隙，而且使在高分辨率下研究活细胞成为可能，比如应用这一原理制备的录像增差显微镜技术(video-enhance microscopy)可以观察微管上颗粒的运动。

二、电子显微镜技术

虽然光学显微镜技术仍然在细胞生物学研究中起着主要的作用，然而光镜的分辨率由于受照射光波长的限制只能达到一定限度，所以要研究细胞内部的精细结构，就必须借助于分辨率更高的电子显微镜(electron microscope)。

(一)电子显微镜的基本知识

电子显微镜在基本原理上与光学显微镜完全不同，构造也要比光学显微镜复杂得多，但其光路图却十分相近(图 3－3)，所以在学习各种电镜技术之前有必要先了解电子显微镜的有关基本知识。

1. 电子显微镜与光学显微镜的基本区别

电子显微镜的高分辨率主要是因为使用了波长比可见光短得多的电子束作为光源，波长一般小于 0.1 nm。由于光源的不同，又决定了电镜与光镜的一系列不同点：用电磁透镜聚焦；电镜镜筒中要求高真空；图像需用荧光屏来显示或感光胶片作记录。它们的基本区别见表 3－1。

2. 电子显微镜的分辨本领与有效放大倍数

如前所述，人眼的分辨率一般为 0.2 mm，光学显微镜的分辨率为 0.2 μm 左右，其放大倍数为 0.2 mm/0.2 μm，即 1 000 倍。而电子显微镜的分辨率可达 0.2 nm，其放大倍数为 10^6 倍。上述放大倍数称之为有效放大倍数；如继续通过光学手段放大也不会得到任何有意义的信息，因此称之为“空放大”。

电镜的分辨率与分辨本领并不等同，电镜的分辨本领是指电镜处于最佳状

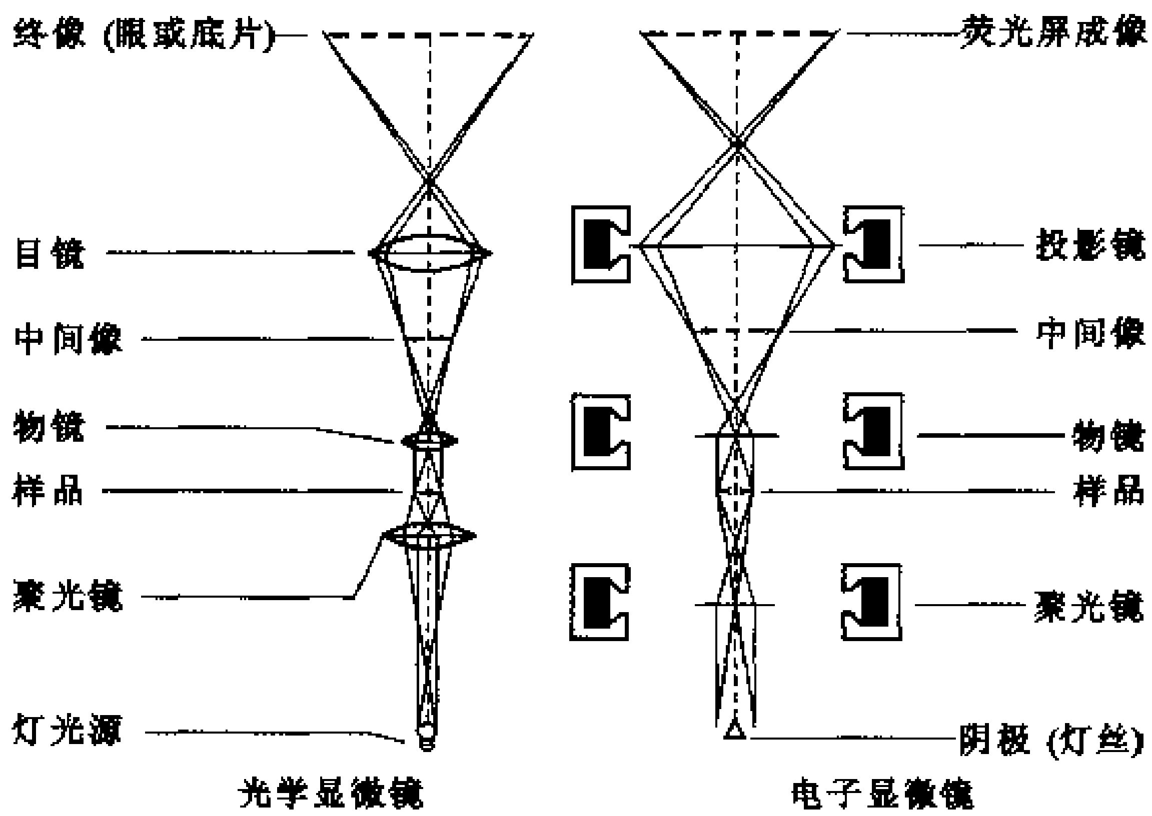


图 3－3　电镜与光镜光路图比较

态下的分辨率。实际情况下，电镜的实际分辨率常常受到生物制样技术本身的限制，如在超薄切片样品中其分辨率约为超薄切片厚度的 1/10，即通常切片厚度若是 50 nm，其实际分辨率约为 5 nm，远低于电镜的分辨本领 0.2 nm。

表 3－1　电子显微镜与光学显微镜的基本区别

	分辨本领	光　源	透　镜	真　空	成像原理
光学显微镜	200 nm	可见光（波长 400～700 nm）	玻璃透镜	不要求真空	利用样品对光的吸收形成明暗反差和颜色变化
	100 nm	紫外光（波长约 200 nm）	玻璃透镜	不要求真空	
电子显微镜	接近 0.1 nm	电子束（波长 0.01～0.9 nm）	电磁透镜	1.33×10^{-5}～1.33×10^{-3}Pa	利用样品对电子的散射和透射形成明暗反差

3. 电子显微镜的基本构造

电子显微镜主要由以下四部分组成(图 3－4)：① 电子束照明系统：包括电子枪、聚光镜。由高频电流加热钨丝发出电子，经高电压使电子加速，经过聚光镜汇聚成电子束；② 成像系统：包括物镜、中间镜与投影镜等。它们是若干精密加工的中空圆柱体，里面装置线圈，通过改变线圈的电流大小，调节圆柱体空间的磁场强度。电子束经过磁场时发生螺旋式运动，最终的结果如同光线通过玻璃透镜时一样，聚焦成像；③ 真空系统：用两级真空泵不断抽气，保持电子枪、镜筒及记录系统内的高真空；④ 记录系统：电子成像须通过荧光屏显示用于观察，或用感光胶片记录下来。

（二）主要电镜制样技术介绍

由于电子显微镜本身的分辨能力与性能在不断提高，生物样品制备技术在

不断改进，以及电子显微镜技术在细胞生物学研究中所发挥的巨大作用，因此，对电镜观察的生物样品有一些特殊要求：① 要求样品很薄。电子束的穿透能力是十分有限的，即使电场高压增加到 100～200kV，电子穿透生物样品的厚度仅达 1 μm。故此，用电镜观察样品的精细结构时，首先要求样品很薄，一般是数十纳米。即使是细菌与其他单细胞生物，假如不经过超薄切片，内部的细微结构也很难观察清楚。所以，超薄切片(ultrathin section)技术是基本的电镜实验技术；② 要求更好地保持样品的精细结构。一般样品制备都要经过一个复杂的过程：固定、脱水、包埋、切片、染色等。所以要使样品尽量保持生活状态下的精细结构而不严重失真，对固定剂与包埋剂的选择以及固定与包埋的条件均要求比较严格。

1. 超薄切片技术

由于电子束的穿透能力有限，为获得较高分辨率，切片厚度一般仅为 40～50 nm，即一个直径为 20 μm 的细胞可切成几百片，故称超薄切片。这需要样品既要有一定刚性又要有一定韧性，而生物样品并不具备这些特性。为此，样品往往需要包埋在特殊的介质中。但包埋的过程会破坏样品的结构，所以超薄切片样品制备的第一步就是样品的固定，以便更好地保存细胞的精细结构。

(1) 固定

如何保持观察样品的真实性，固定是很重要的一环。固定不仅要求保持样品的形态结构不发生改变，有时甚至要求在超微和分子水平上使细胞内部的结构和成分保持在原来的位置上，同时尽量保持原来的性质，如抗原性等。根据需要选择最合适的固定剂，超薄切片常用的固定剂为锇酸(OsO_4)和戊二醛等(表 3－2)。此外，还可以用物理方法固定，如高频微波。

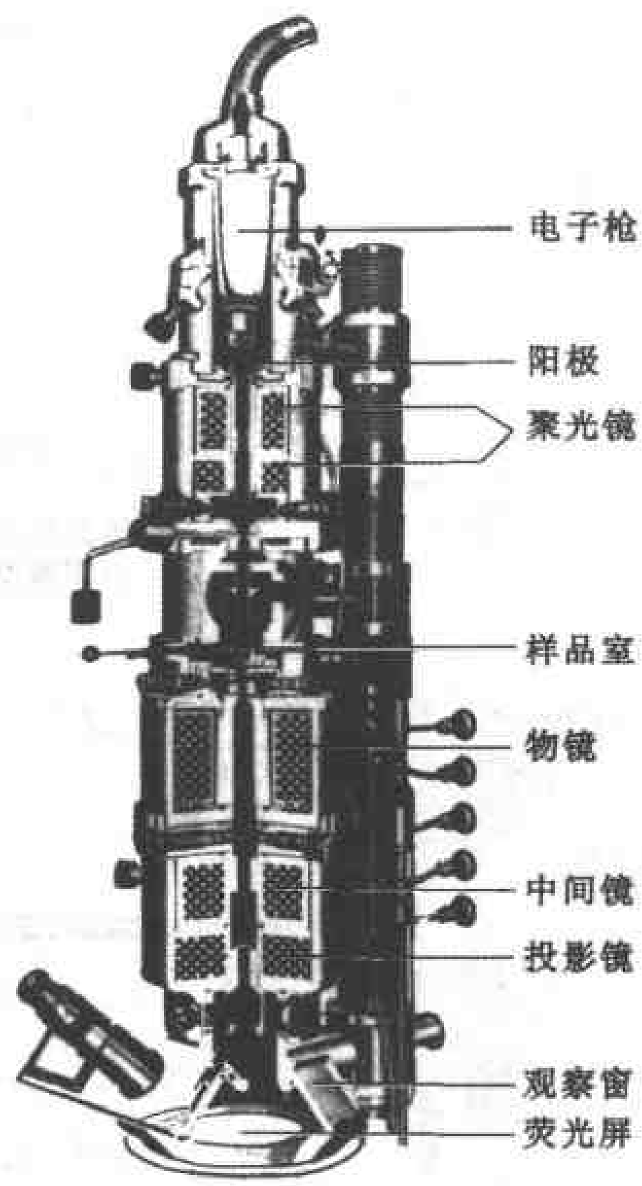


图 3－4　透射电子显微镜剖面图

在固定操作过程中，动物的处死和取材都要快速进行，并通常在低温下固定，以防止酶的自溶作用造成破坏，固定的样品块也不宜太大，以便固定剂迅速渗透。

表 3－2　几种固定剂对细胞各成分的固定效果

固定剂	核　酸	蛋白质	磷　脂	多　糖	不饱和脂肪酸
OsO_4	+	+ +	+ + +	+	+ + +
戊二醛	+	+ +	+	+	+
$KMnO_4$	+	+ + +	+ + +	+	+ + +

+　表示相对固定效果

(2) 包埋

包埋的目的是要使样品中各种细微结构在切片过程中都得到均匀良好的支撑,使切成的超薄切片仍能保持连续完整并且有足够的强度,并能耐受干燥以及观察时的电子轰击、高温和真空挥发。要求包埋剂在高倍放大时不显示其本身结构;在聚合时不发生明显的收缩,以防止样品中细微结构的损坏和移位;具有良好的机械性能(如刚性和韧性等)以利于切片;易被电子穿透等。目前常用的包埋剂是环氧树脂。生物样品固定后通常仍含有大量水分,而包埋剂又多是与水不相溶的,因此在包埋前通常要经过一系列脱水处理过程。

(3) 切片

超薄切片过程如图 3-5 所示。切片厚度通常是 40~50 nm。切片厚度可通过样品杆的金属热膨胀或机械伸缩来控制。切片刀以玻璃或钻石为材料,最常用的是玻璃刀。切片须捞在覆有支持膜(如透明塑胶膜)的载网(铜网或镍网)上才能在电镜下观察。

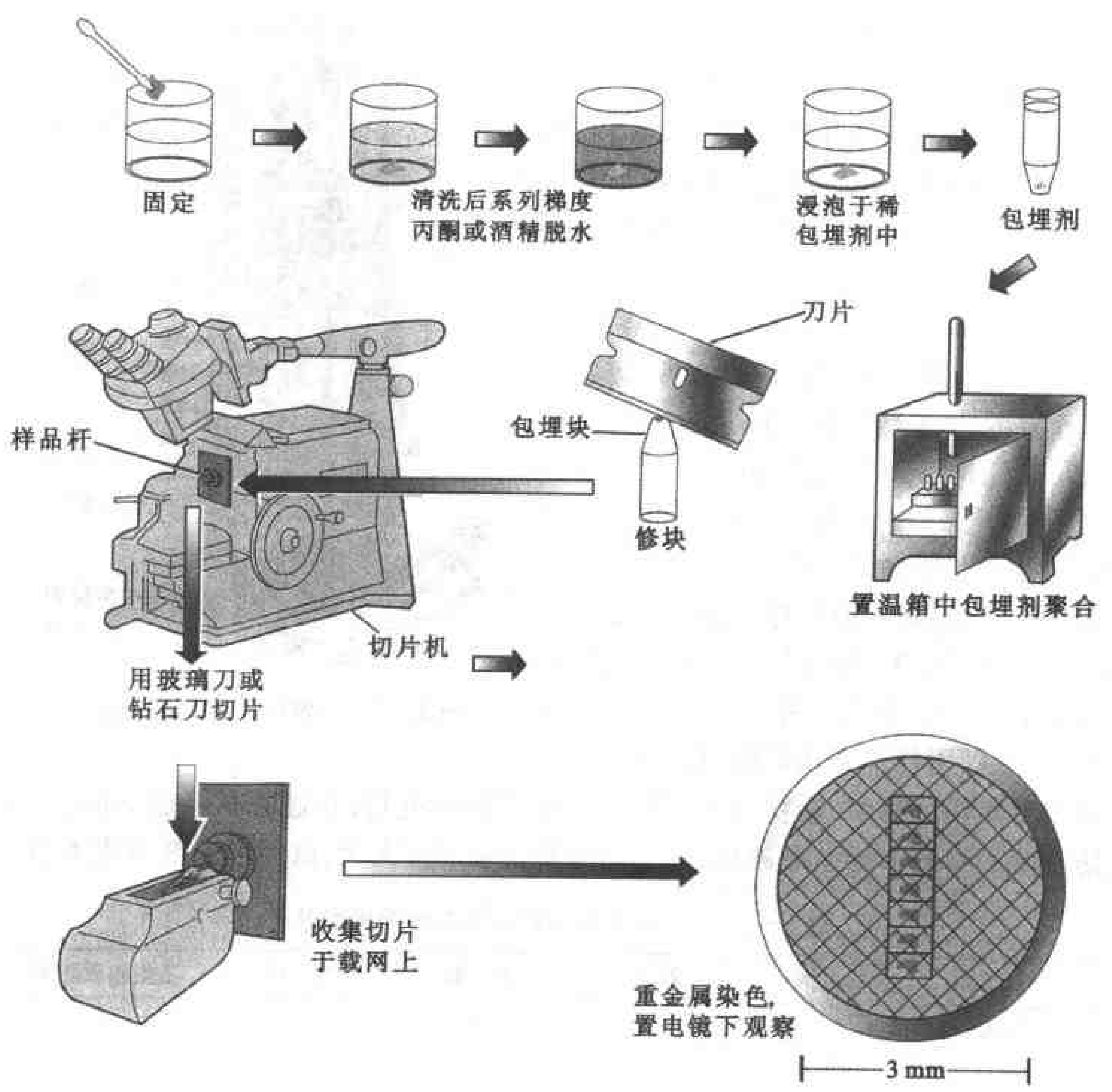


图 3-5　用于电镜观察的生物样品制备过程示意图(引自 Karp,1999)

(4) 染色

样品中的不同成分对各种"染料"有不同的亲和性，如锇酸宜染脂肪；铅盐易染蛋白质；醋酸铀易染核酸等。电镜样品仅用重金属盐进行染色以形成明暗反差，因此，只能通过电子束振幅的改变观察到黑白图像。它不能像光镜切片染色那样通过改变波长而获得彩色图像。

几乎各种细胞超微结构都可以用超薄切片法观察。图 3－6 即是超薄切片技术显示的典型动物细胞的超微结构。不仅如此，超薄切片技术还可以与放射性同位素自显影、细胞化学、免疫电镜和电镜原位杂交等技术结合，用于不同目的的研究。

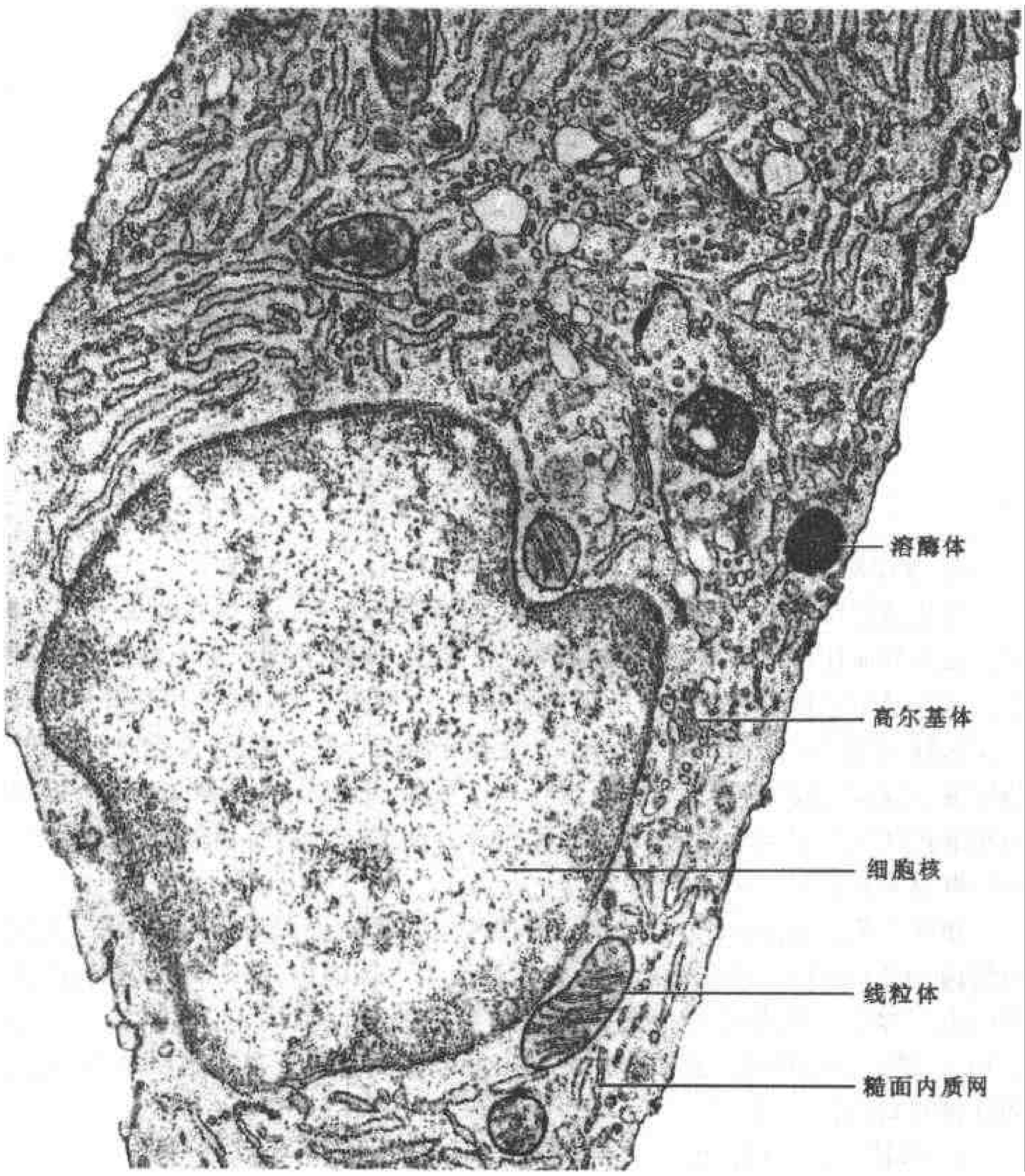


图 3－6　大鼠骨髓干细胞的超薄切片(引自 G.M.Wright *et al*.)

2. 负染色技术

某些结构，如线粒体基粒、核糖体和蛋白质及其组成的纤维甚至病毒等可以通过负染色(negative staining)电镜技术观察其精细结构，其分辨率可达 1.5 nm 左右。负染色是用重金属盐，如磷钨酸或醋酸双氧铀，对铺展在载网上的样品进行染色，吸去多余染料，样品经自然干燥后，整个载网上都铺上了一薄层重金属盐，从而衬托出样品的精细结构(图 3-7)。

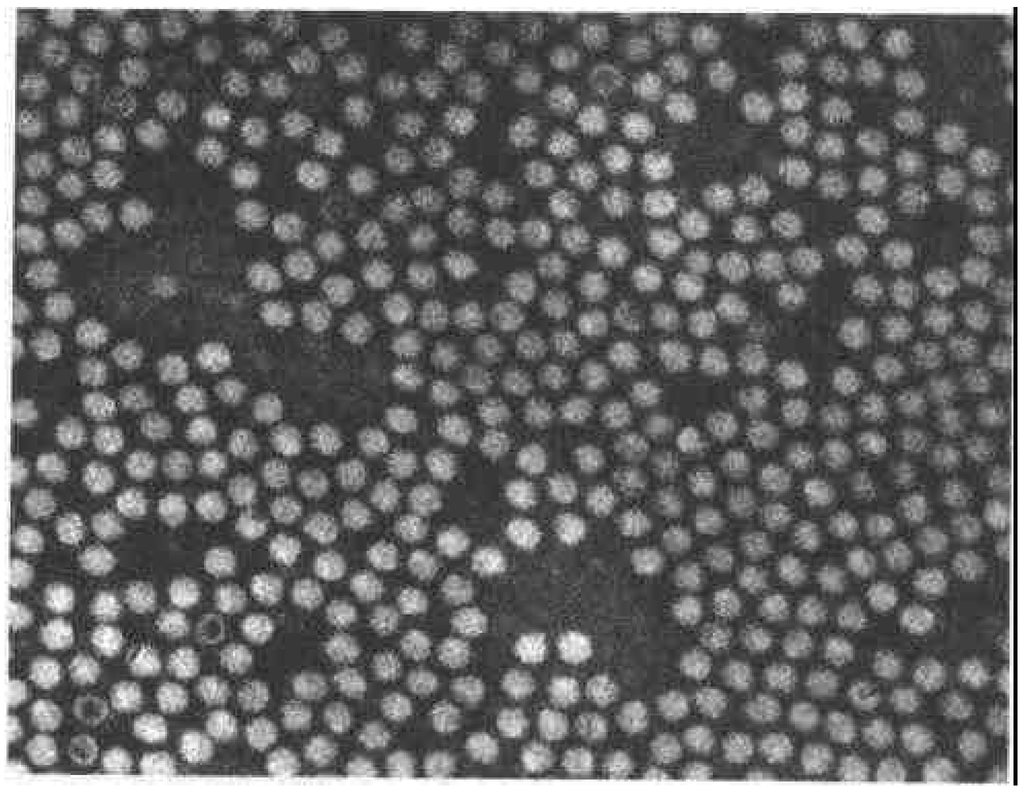


图 3-7　家蚕细小病毒负染色电镜照片
(病毒直径 20 nm)(陈立华，翟中和)

3. 冷冻断裂和冷冻蚀刻电镜技术

用快速低温冷冻法将样品迅速冷冻(液氮或液氦中)，然后在低温下进行断裂。这时样品往往从其结构相对“脆弱”的部位(即膜脂双分子层的疏水端)断裂。从而显示出镶嵌在膜脂中的蛋白质颗粒，由于冰在真空中的少量升华，可进一步增强“浮雕”式的蚀刻效果。用铂、金等金属进行倾斜喷镀，以形成对应于凹凸的电子反差，再经碳垂直于断面进行真空喷镀，形成一个连续的碳膜，然后用消化液把样品本身消化掉，将剩下的碳膜及其构成图形的金属微粒移到载网上进行电镜观察(图 3-8)。

冷冻蚀刻(freeze etching)技术主要用来观察膜断裂面的蛋白质颗粒和膜表面结构，图形富有立体感，样品不需包埋甚至也不需固定，同时能更好地保持样品的真实结构。近年来发展起来的快速冷冻深度蚀刻技术(quick freeze deep etching)就是在此基础上发展起来的。深度蚀刻主要用于观察胞质中的细胞骨架纤维及其结合蛋白。

4. 电镜三维重构技术

生物大分子的三维结构是当今生命科学研究中的核心课题之一。电镜三维重构技术是电子显微术、电子衍射与计算机图像处理相结合而形成的具有重要

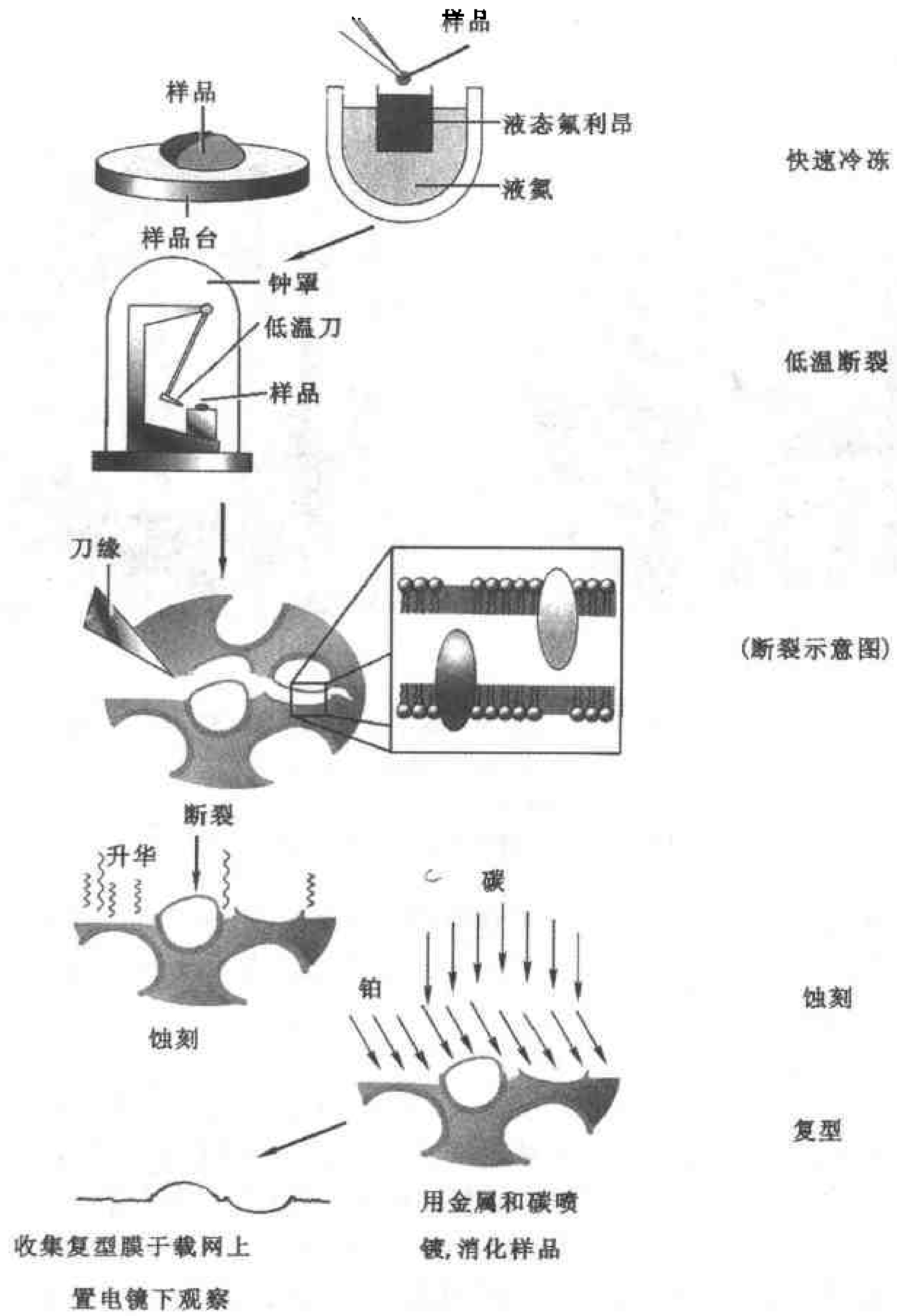


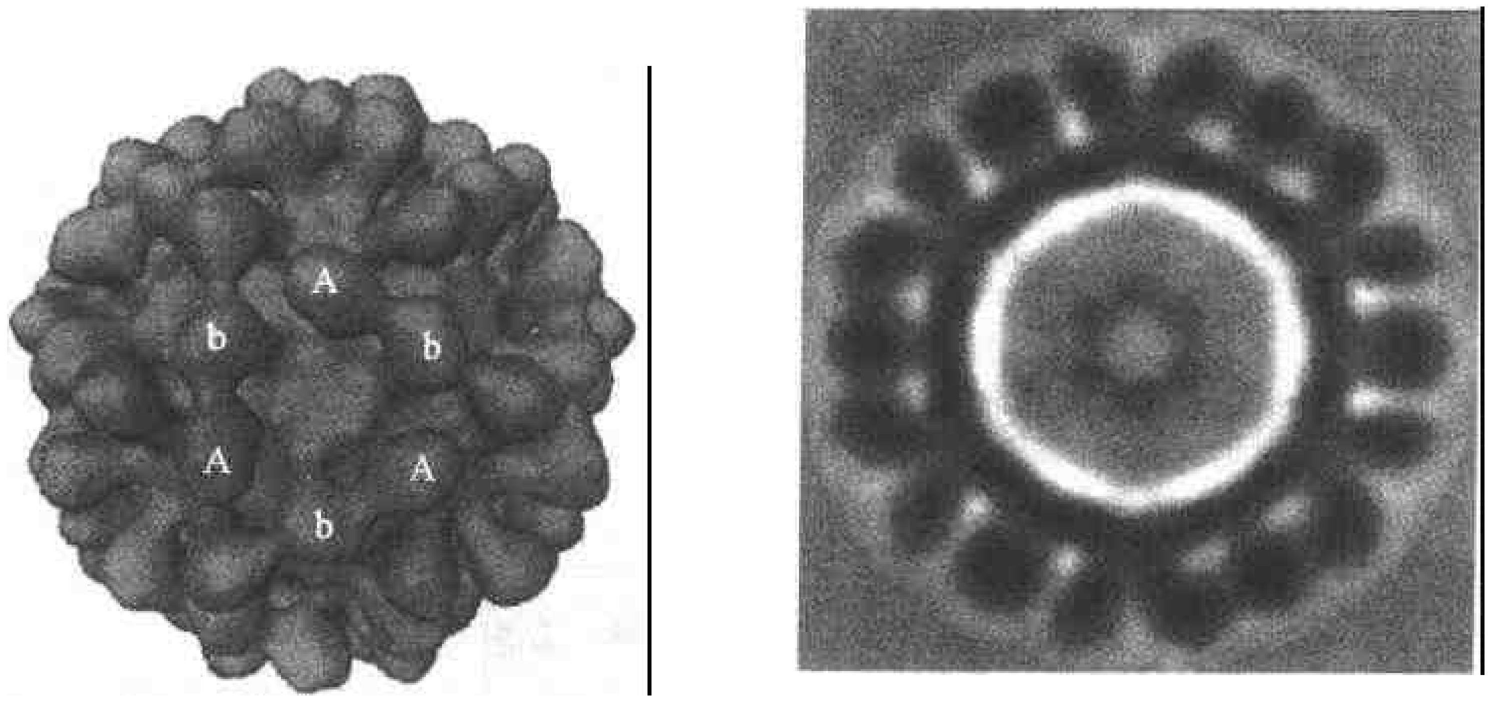
图 3-8 冷冻断裂-蚀刻复型技术示意图

应用前景的一门新技术,尤其适于分析难以形成三维晶体的膜蛋白以及病毒和蛋白质-核酸复合物等大的复合体的三维结构。

其基本步骤是对生物样品(如蛋白质二维晶体)在电镜中的不同倾角下进行拍照,得到一系列电镜图片后再经傅里叶变换等处理,从而展现出生物大分子及其复合物三维结构的电子密度图(图 3-9)。

最早提出并发展这一技术的是英国生物物理学家 A.Klug,他因此获得 1982 年诺贝尔化学奖。近年来在此基础上发展了低温电镜技术(cryoelectron microscopy),其样品不经固定、染色和干燥,直接包被在玻璃态(vitrification)的

冰膜中，在约 -160℃ 的电镜冷冻样品台上利用相位衬度成像。该技术不仅更真实地展示出生物大分子及其复合物的空间结构，而且还具有高分辨率。



A　　　　B

图 3-9　根据低温电镜图像和三维重构技术所显示的我国兔出血症病毒的三维密度图

A：为沿三次轴观察的密度图；

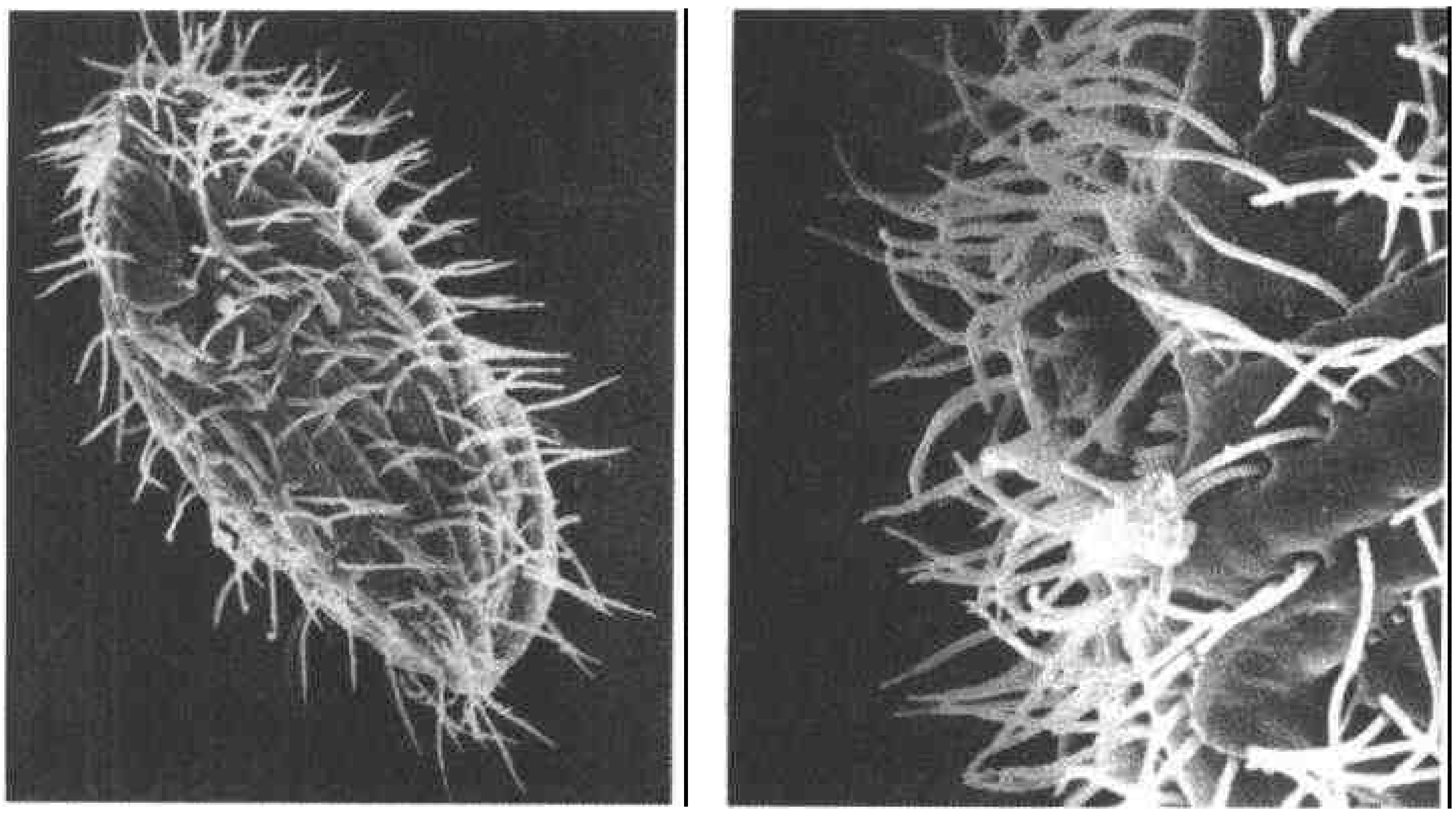
B：为病毒颗粒垂直于三次轴的中心切片，显示三维重构的密度分布

电镜三维重构技术与 X 射线晶体衍射技术及核磁共振分析技术相结合，是当前结构生物学（structural biology）——主要研究生物大分子空间结构及其相互关系的主要实验手段。

5. 扫描电镜技术

扫描电镜（scanning electron microscope, SEM）是 20 世纪 60 年代才正式问世的。其电子枪发射出的电子束被电磁透镜汇聚成极细的电子"探针"，在样品表面进行"扫描"，电子束可激发样品表面放出二次电子（同时也有一些其他信号）。二次电子产生的多少与样品表面的形貌有关。二次电子由探测器收集，并在那里被闪烁器转变成光信号，再经光电倍增管和放大器又转变成电压信号来控制荧光屏上电子束的强度。这样，样品不同部位上产生二次电子多或少的差异，直接反映在荧光屏相应部位亮或暗的差别，从而得到一幅放大的立体感很强的图像（图 3-10）。

扫描电镜主要是用来观察样品表面的形貌特征，而生物样品在干燥过程中由于表面张力的作用极易发生变形，解决这一问题最常用的是 CO_2 临界点干燥法，即利用 CO_2 在其临界温度以上就不再存在气-液相面，也就不存在引起样品变形的表面张力问题，从而完成生物样品的干燥。通常用液态 CO_2 等介质浸透样品，然后在临界温度以上使 CO_2 以气态形式逸去。由于没有气-液相面的形成，也就没有表面张力，样品的形态能得到很好的保持。此外，为了得到良好的二次电子信号，样品表面需良好的导电性，所以样品在观察前还要喷镀一层金膜。



A　　　　B

图 3-10　四膜虫的扫描电镜图像(韩飞,丁明孝)
A: 全虫;B: 部分放大

扫描电镜景深长,成像具有强烈的立体感。一般扫描电镜的分辨本领仅为 3 nm,近几年研制的低压高分辨扫描电镜分辨本领可达 0.7 nm,可用于观察核孔复合体等更精细的结构。

尽管电子显微镜具有分辨率高这一光学显微镜无可比拟的优越性,但直至目前人们还不能用它来观察活的生物样品,而且难以观察细胞的全貌,因此在很多研究中仍需这两者相结合。

三、扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope,STM)是 IBM 苏黎世实验室的 Binnig,Rohrer,Gerber 和 Weible 于 1981 年发明的。它是一种探测微观世界物质表面形貌的仪器。Binnig 和 Rohrer 因此而获得 1986 年的诺贝尔物理学奖。

STM 主要原理是利用了量子力学中的隧道效应,即通常在低压下,二电极之间具有很大的阻抗,阻止电流通过,称之为势叠。当二电极之间近到一定距离(100 nm 以内)时,电极之间产生了电流,称隧道电流。这种现象称隧道效应,并且隧道电流(I)和针尖与样品之间的间距(d)呈指数关系[一维近似 $I \propto \exp(-2Kd)$,K 为常数],这样 d 可转化为 I 的函数而被测定,针尖的位置就可以确定,由此样品的表面形貌也可确定。

STM 的主要装置包括实现 X、Y、Z 三个方向扫描的压电陶瓷,逼近装置,电子学反馈控制系统和数据采集、处理、显示系统。

STM 的主要特点:① 具有原子尺度的高分辨本领,侧分辨率为 0.1～

0.2nm,纵分辨率可达0.001nm;② 可以在真空、大气、液体(接近于生理环境的离子强度)等多种条件下工作,这一点在生物学领域的研究中尤其重要;③ 非破坏性测量。因为扫描时不接触样品,又没有高能电子束轰击,基本上可避免样品的形变。

目前,STM作为一种新技术,已被广泛应用于生命科学各研究领域。人们已用STM直接观察到DNA、RNA和蛋白质等生物大分子及生物膜、病毒等的结构。与其功能类似的还有原子力显微镜(atomic force microscope)等十余种,统称为扫描探针显微镜。可以预料,它们将在纳米生物学研究领域中发挥越来越重要的作用。

第二节　细胞组分的分析方法

形态学观察与细胞成分分析相结合是当代细胞生物学研究中常常采用的实验方法。它为揭示生物大分子在细胞内的构建相互关系及细胞内的功能方面提供了有力的工具。

一、用超速离心技术分离细胞器与生物大分子及其复合物

用低渗匀浆、超声破碎或研磨等方法可使细胞膜破损,形成细胞核、线粒体、叶绿体、内质网、高尔基体、溶酶体等细胞器和细胞组分的混合匀浆,再通过

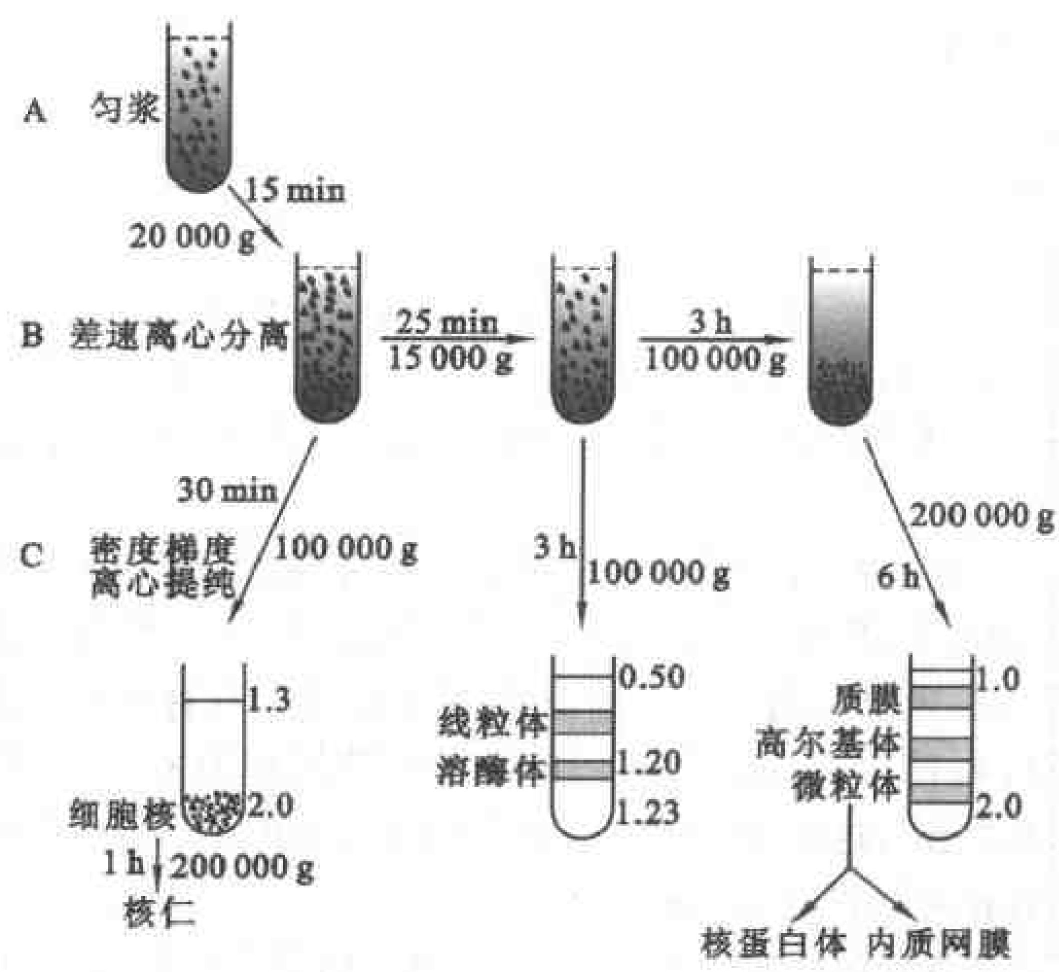


图3-11　差速离心结合密度梯度离心分离细胞组分示意图

差速离心(differential centrifugation)，即利用不同的离心速度所产生的不同离心力，将各种亚细胞组分和各种颗粒分开。

密度梯度离心是将要分离的细胞组分小心地铺放在含有密度逐渐增加的、形成密度梯度的、高溶解性的、惰性物质(如蔗糖)溶液的表面。在这种条件下进行离心，不同组分以不同的沉降速率沉降，形成不同的沉降带。各组分的沉降速率与它们的形状和大小有关，通常以沉降系数(S 值)表示。超速离心机可达 8×10^4r/min，产生 50 万倍重力场。在这巨大离心力的作用下，甚至相当小的 tRNA(沉降系数 4S)和单一的酶都可根据其沉降系数相互分离开。

差速离心与密度梯度离心相结合可以达到更精细的分离(图 3－11)。

二、细胞内核酸、蛋白质、酶、糖类与脂质等的显示方法

为了测定蛋白质、核酸、多糖和脂质等细胞组分，通常利用一些显色剂与所检测物质中一些特殊基团特异性结合的特征，通过显色剂在细胞中的定位及颜色的深浅来判断某种物质在细胞中的分布和含量。

例如福尔根(Feulgen)反应可以特异显示 DNA 的分布：酸水解可以去除 RNA，仅保留 DNA，并除去 DNA 上嘌呤脱氧核糖核苷酸的嘌呤，使脱氧核糖的醛基暴露。所暴露的自由醛基与希夫(Schiff)试剂反应呈紫红色。PAS 反应则可确定多糖的存在，其原理同样是利用希夫试剂与醛基之间的反应，这时的醛基来自过碘酸氧化多糖的 1,2－乙二醇基，使醛基释放。因为多糖类物质都能产生 PAS 反应，所以可以用不同方式改进其反应特异性。

四氧化锇与不饱和脂肪酸反应呈黑色，用以证明脂肪滴的存在。苏丹Ⅲ(深红色)通过扩散进入脂滴中，使脂滴着色。苏丹黑也溶于磷脂和胆固醇中，产生较大的颜色反差。

样品中的蛋白质成分也有多种检测方法。在米伦(Millon)反应中，氮汞试剂与组织中的蛋白质侧链上的酪氨酸残基反应，形成红色沉淀。在重氮反应中，氢氧化重氮与酪氨酸、色氨酸和组氨酸起反应形成有色的复合物。蛋白质中的—SH 基可用形成硫醇盐共价键的试剂进行检测。

由于大多数固定剂对酶都有钝化作用，所以，在进行细胞中某种酶的定性研究时，样品制备或采用冷冻切片，或以冷丙酮、甲醛进行短期固定，以尽量保持酶的活性，然后将样品(细胞或组织切片)与适宜底物共同温育。例如检测碱性磷酸酶的格莫瑞(Gomori)方法，是用甘油磷酸酯作底物，由于酶水解释放的磷酸根，在 Ca^{2+} 存在的情况下转变成不溶性的磷酸钙，进而转变成金属银或硫化铅、硫化钴或其他有颜色的化合物，金属沉淀或颜色的存在部位，即碱性磷酸酶存在的活性部位。

三、特异蛋白抗原的定位与定性

20 世纪 70 年代以来，免疫学的迅速发展为细胞生物学的研究提供了强有力的手段，特别是在细胞内特异蛋白的定位与定性方面，单克隆抗体与其他一些检测手段相结合发挥了重要作用。免疫荧光与免疫电镜是最常见的研究细胞内蛋白质分子定位的重要技术，而对蛋白质进行体外分析定性通常则采用免疫印迹(western blotting)和放射免疫沉淀(radioimmuno-precipitation)等技术，这里不再一一介绍。

(一) 免疫荧光技术

前面已经介绍了荧光显微镜技术，其中也提到免疫荧光技术(immunofluorescence technigue)。所谓免疫荧光技术就是将免疫学方法(抗原抗体特异结合)与荧光标记技术相结合用来研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法。它主要包括荧光抗体的制备、标本的处理、免疫染色和观察记录等过程。标本处理有多种方法，组织切片、冷冻切片、整装细胞都可应用，其宗旨只有一个，即要尽量完好地保持被检测蛋白的抗原性；免疫染色就是抗原抗体反应的过程，这里要注意设立各种实验对照以检验结果的可靠性。除免疫荧光技术外，还可用免疫酶标记技术，即以酶(如辣根过氧化物酶)代替荧光素与抗体偶联，因此可在普通显微镜下观察。近年来，共焦点激光扫描显微镜的应用使免疫荧光技术在细胞生物学研究中发挥了越来越大的作用。

(二) 免疫电镜技术

免疫荧光技术快速、灵敏、有特异性，但其分辨率有限。同样用抗原抗体反应的原理，免疫电镜技术则能有效地提高样品的分辨率，在超微结构水平上研究特异蛋白抗原的定位。

免疫电镜技术可分为免疫铁蛋白技术、免疫酶标技术与免疫胶体金技术，这也代表了免疫电镜技术的发展过程。目前，免疫铁蛋白技术几乎已无人问津，而免疫胶体金技术则受到越来越多的细胞生物学工作者的青睐。直径在 1～100 nm 的胶体金本身具有许多优点，如：金颗粒容易识别，并且具有很高的分辨率；可以制成不同直径大小的金颗粒，用以双重标记或多重标记；既可用于超薄切片，也可以用于装配制备的骨架成分和膜系统蛋白成分的标记。

免疫电镜技术中最关键的问题同样是保持样品中蛋白的抗原性，并且要设立严格的对照。此外，在免疫电镜技术中，还必须注意尽量保存样品的精细结构。免疫电镜技术至今已在以下方面得到广泛应用，如：蛋白分泌的研究，通过对分泌蛋白的定位，可以确定某种蛋白的分泌动态；胞内酶的研究；一些结构蛋白的研究，包括膜蛋白的定位与骨架蛋白的定位等，图 3－12 是相对分子质量为 280×10^3 的核骨架蛋白的定位。

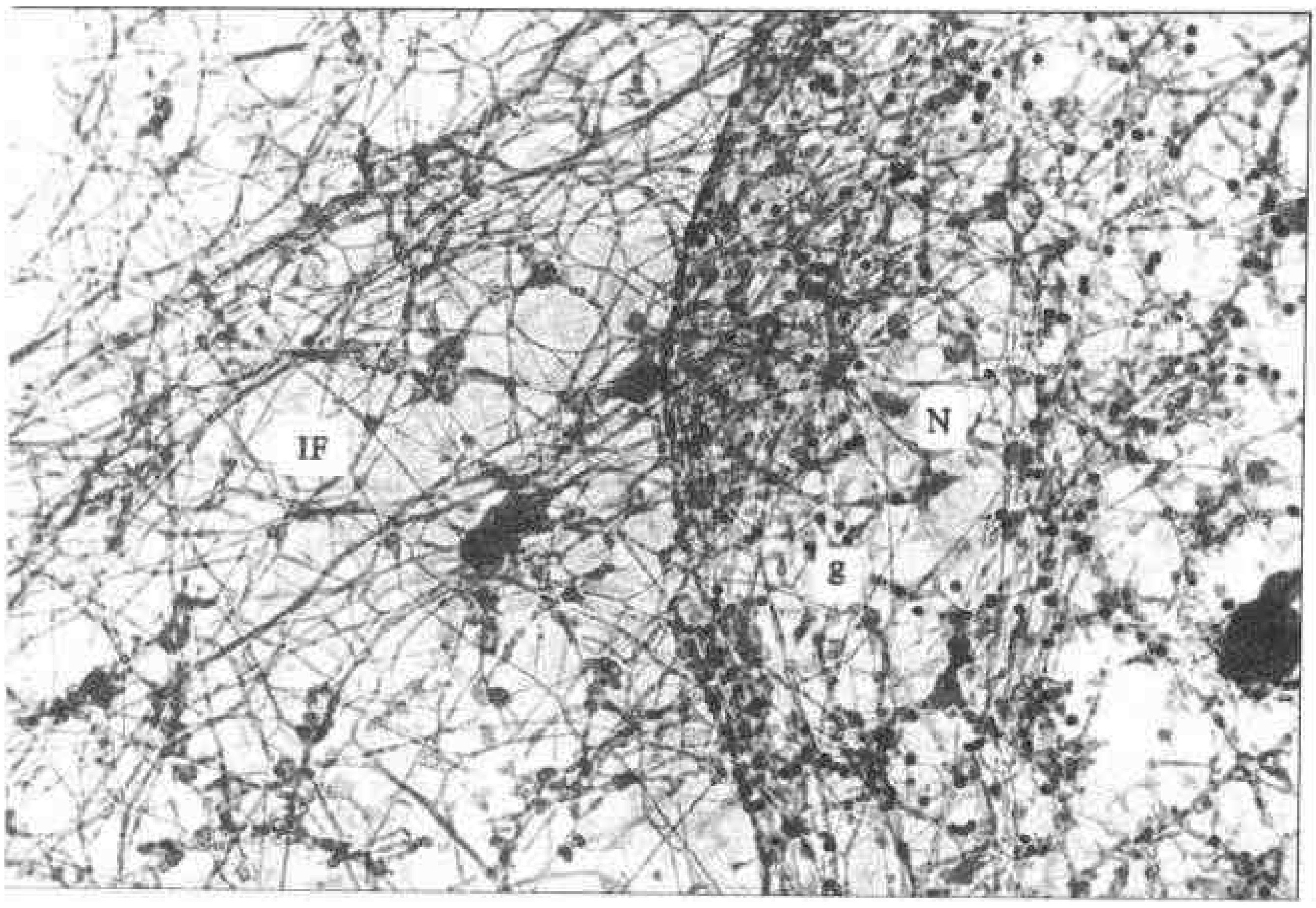


图 3－12　体外培养的 BHK－21 细胞经选择性抽提后用抗 Mr 280×10^3 核骨架蛋白抗体进行免疫胶体金标记的结果(焦仁杰,吴冬兰)

IF：中间纤维；　g：金颗粒；　N：核区

四、细胞内特异核酸序列的定位与定性

细胞内特异核酸(DNA 或 RNA)序列的定性与定位通常采用原位杂交技术(*in situ* hybridization)。用标记的核酸探针通过分子杂交确定特殊核苷酸序列在染色体上或在细胞中的位置的方法称为原位杂交。

原位杂交技术首先是在光镜水平上发展起来的，放射性同位素标记的探针与样品中的 DNA 或 RNA 杂交后，用显微放射自显影的方法显示杂交物的存在部位；或用荧光素标记的探针进行杂交，在荧光显微镜下直接显示与探针杂交的核酸存在部位。近年来，随着免疫胶体金技术在细胞生物学研究中的应用，电镜原位杂交技术得到广发展。电镜原位杂交能将特异核苷酸序列的定位与细胞的超微结构结合起来，其基本原理与光镜原位杂交类似，只是探针标记物不同，以生物素等一些生物小分子代替同位素或荧光素标记探针，杂交反应的检测是通过与抗生物素抗体相连的胶体金颗粒显示出来的。

原位杂交技术在显微与亚显微水平上的基因定位、特异 mRNA 表达等问题的研究中起重要作用。

五、利用放射性标记技术研究生物大分子在细胞内的合成动态

放射自显影技术是利用放射性同位素的电离辐射对乳胶(含 AgBr 或 AgCl)

的感光作用，对细胞内生物大分子进行定性、定位与半定量研究的一种细胞化学技术。对细胞内生物大分子进行动态研究和追踪(pulse-chase)是这一技术的独具特征。放射自显影技术包括两个主要步骤：即同位素标记的生物大分子前体的掺入和细胞内同位素所在位置的显示。经常应用于生物学研究的同位素及其性质如表 3－3，根据实验要求可选择合适的同位素。

表 3－3 常用放射性同位素的基本特点(用 β 射线)

同位素	放射性粒子	在乳胶内的射程	半衰期
^{32}P	硬 β	数毫米	14.2 天
^{14}C	中等能量 β	平均 10 μm	5 760 年
^{3}H	软 β	0.8 μm	12.3 年
^{35}S	中等能量 β	10 μm～1 mm	87 天
^{131}I	中等能量 β	10 μm～1 mm	8 天

研究 DNA 合成时通常是用氚(^{3}H)标记的胸腺嘧啶脱氧核苷(^{3}H－TdR)，研究 RNA 合成时是用氚标记的尿嘧啶核苷(^{3}H－U)；在研究含硫蛋白分子代谢时，可用^{35}S 标记的蛋氨酸和半胱氨酸，^{3}H 或^{14}C 标记的蛋氨酸、亮氨酸等也是常用于蛋白分子合成的前体。

同位素标记的前体物掺入细胞即标记，标记后可用自显影方法追踪被标记物在细胞中的位置与代谢速率。专门用于放射自显影的乳胶称为核子乳胶，其成分与普通感光乳胶相似，乳胶中卤化银晶体颗粒的大小与密度均有严格的要求，以提高分辨率与灵敏度。

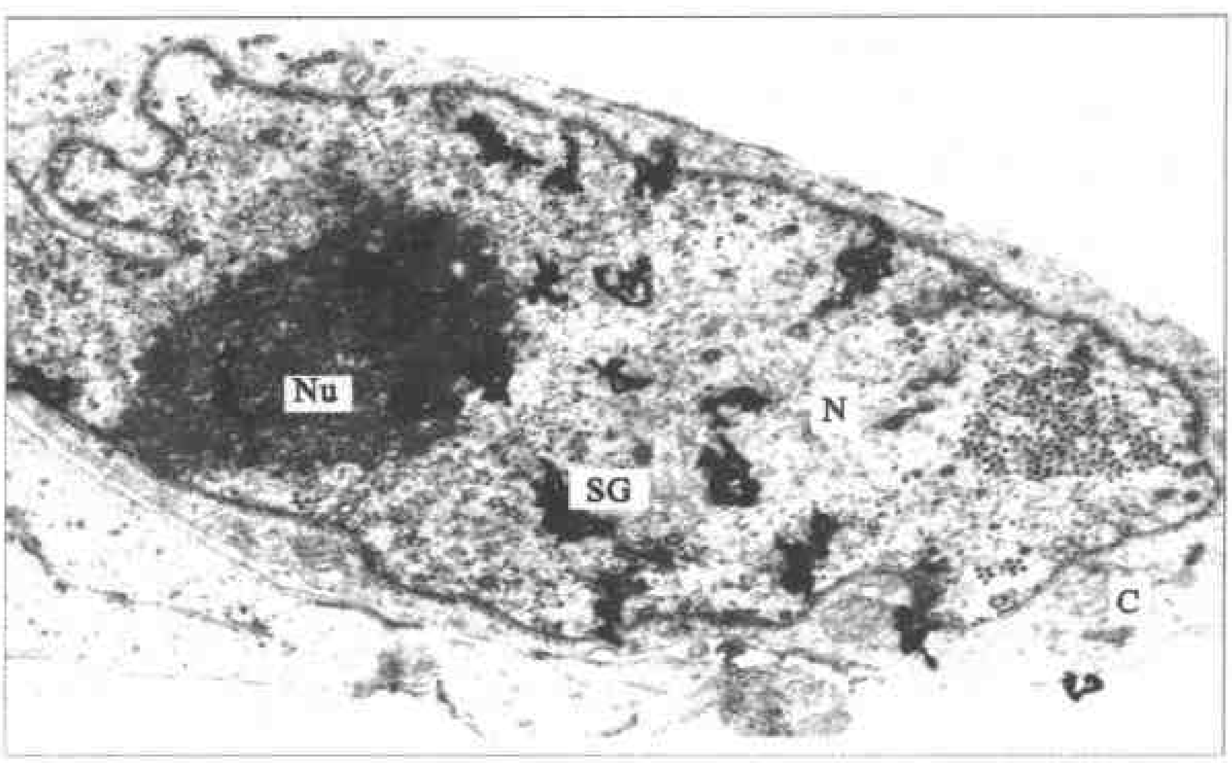


图 3－13 鸭瘟病毒感染鸡胚成纤维细胞 24 h 后，用^{3}H－尿嘧啶核苷脉冲标记 10 min 的电镜放射自显影图片(丁明孝，翟中和)

在病毒大量复制与装配的宿主细胞中，核仁(Nu)依然存在，并保持其转录功能

SG：银颗粒；N：细胞核；Nu：核仁；C：细胞质

显微放射自显影的基本实验步骤如下：首先用合适的放射性前体分子标记机体或细胞，根据实验的需要，按标记的持续时间分为持续标记和脉冲标记。标记后的组织与细胞可按常规方法制片，在暗室中向样品表面均匀地敷一层厚约3～10μm的乳胶，然后在暗盒中曝光（或称自显影）数天，再经显影、定影后于显微镜下观察。细胞中银颗粒所在的部位即代表放射性同位素的标记部位。

电镜放射自显影技术的基本原理与显微自显影相同，实验操作过程亦相似。与显微自显影不同之点是样品制备与敷乳胶的要求更为严格，尽量在超薄切片上敷涂一层卤化银单晶体层的乳胶。曝光时间一般长达数月。图3－13是电镜放射自显影图片，显示细胞核内RNA的合成部位。

六、定量细胞化学分析技术

前面介绍了细胞内不同成分的细胞化学定性与定位方法。然而蛋白或核酸等生物大分子在某个细胞中或细胞群体中的含量分析对了解该物质的生物学功能是十分重要的，因此下面介绍两种细胞化学的定量分析方法。

（一）显微分光光度测定技术

细胞显微分光光度术（microspectrophotometry）是利用细胞内某些物质对特异光谱吸收的原理，用来测定这些物质如核酸与蛋白质等在每一个细胞内含量的一种实验技术，如DNA对紫外线最高吸收波长是260 nm。也可经过特异的染色反应，如DNA经Feulgen染色反应后就可以吸收波长为546nm的可见光波段，与分光光度仪测定溶液成分的方法相比，这种技术不仅可以定位，而且可以灵敏地测出一个细胞内某种成分的含量。

细胞显微分光光度测定法可分为紫外光显微分光光度测定法与可见光显微分光光度测定法。前者是利用细胞内某些物质对紫外光某波段特有的吸收曲线来测定相应物质的含量；后者则是根据某种物质特异的染色反应，然后再测定其对可见光某特定波段的吸收能力来进行对该物质的定量测定。

（二）流式细胞仪

流式细胞仪（flow cytometry）可定量地测定某一细胞中的DNA、RNA或某一特异蛋白的含量，以及细胞群体中上述成分含量不同的细胞的数量，特别是它还可将某一特异染色的细胞从数以万计的细胞群体中分离出来，以及将DNA含量不同的中期染色体分离出来，因此近年来得到越来越广泛的应用。

细胞群体一般需要分散后对待测的某种成分进行特异染色，然后将悬液中的细胞以1个细胞/ms的速度（1 000万细胞/h）一个个地通过流式细胞仪，此时检测器便可测出并记录每个细胞中的待测成分的含量，并根据要求将该成分含量不同的细胞分离出来。如果染色过程不影响细胞活性，那么分离出来的细胞还可以继续培养。

第三节　细胞培养、细胞工程与显微操作技术

一、细胞培养

细胞培养是当前细胞生物学乃至整个生命科学研究与生物工程中最基本的实验技术。近年来细胞生物学一系列主要理论研究的进展，如细胞全能性的揭示，细胞周期及其调控，癌变机制与细胞衰老，基因表达与调控，细胞融合以及一些细胞工程技术的建立都是与细胞培养技术分不开的。在实践方面，植物细胞培养为植物育种开辟了一条崭新的途径；动物细胞培养为疫苗生产、药物研制与肿瘤防治等医学实践提供了全新的手段。细胞培养包括原核生物细胞，如细菌；真核单细胞生物，如酵母菌、四膜虫等；植物细胞与动物细胞的培养以及与此密切相关的病毒的培养。本节扼要介绍动植物细胞培养技术以及与细胞培养直接相关的一些培养技术。

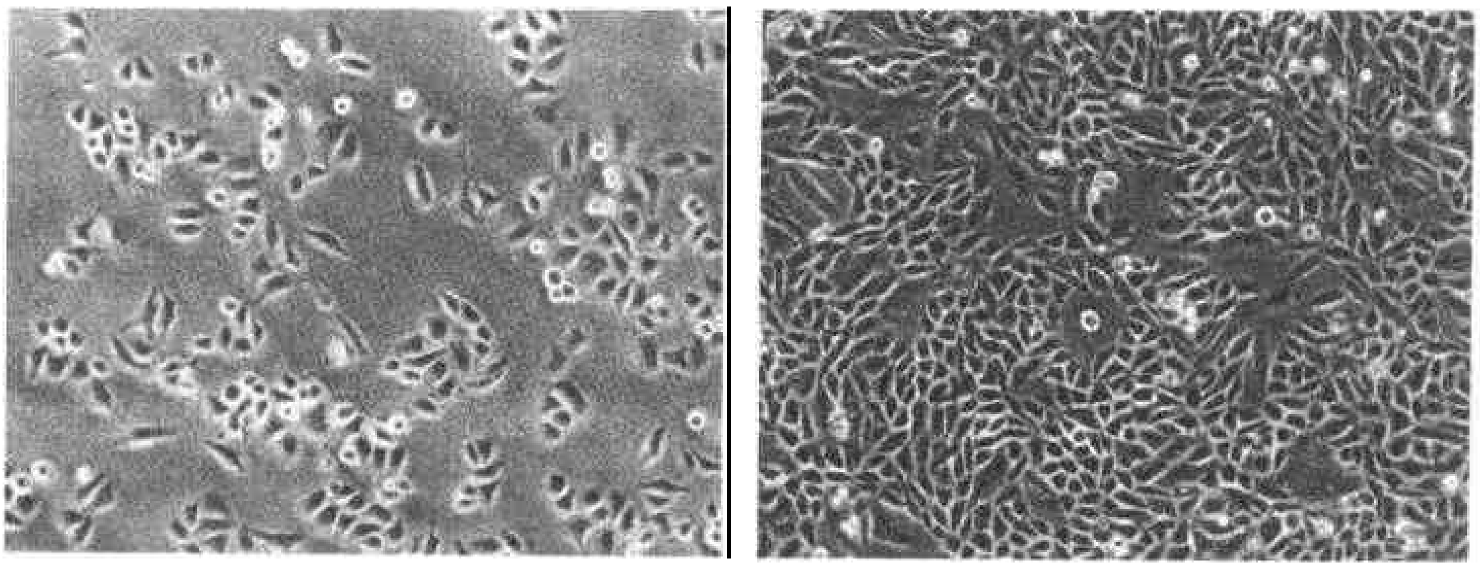
（一）动物细胞培养

体外培养的动物细胞可分为原代细胞（primary culture cell）与传代细胞（subculture cell）。原代细胞是指从机体取出后立即培养的细胞。有人把培养的第 1 代细胞与传 10 代以内的细胞统称为原代细胞培养，适应在体外培养条件下持续传代培养的细胞称为传代细胞。

任何动物细胞的培养均需从原代细胞培养做起。动物很多组织的细胞，如幼年动物的肾、肺、卵巢、精巢、肌肉及肿瘤等组织的细胞较易培养，而神经细胞等则较难培养。原代细胞培养步骤一般如下：首先从健康动物取出组织块，剪碎，用浓度与活性适中的胰酶或胶原酶与 EDTA（螯合剂）等将细胞连接处消化分散，给予良好的营养液与无菌的培养环境（接近体温与体内 pH），在培养瓶中进行静止或慢速转动培养。但不论用何种培养液一般都要加一定量的小牛血清，这样才有利于细胞的贴壁生长与分裂（图 3－14）。

分散的细胞悬液在培养瓶中很快（在几十分钟至数小时内）就贴附在瓶壁上，这就称为细胞贴壁。分散呈圆球形的细胞一经贴壁就迅速铺展并开始有丝分裂，逐渐形成致密的细胞单层，称为单层细胞（single layer cell），这种培养方法称为单层细胞培养。

原代培养的细胞一般传至 10 代左右就不易传下去了，细胞生长出现停滞，大部分细胞衰老死亡，但有极少数细胞可能渡过“危机”而传下去。这些存活的细胞一般又可顺利地传 40～50 代次，并且仍保持原来染色体的二倍体数量及接触抑制的行为，很多学者把这种传代细胞称作细胞株（cell strain）。一般情况下，当细胞株传至 50 代以后又要出现“危机”，不能再传下去。但如有部分细胞发生了遗传突变，并带有癌细胞的特点，有可能在培养条件下无限制地传下去，这种传代细胞称为细胞系（cell line）。细胞系细胞的根本特点是染色体明显改变，一



A　　　　　　　　B

图 3－14　体外培养的细胞(任显辉,邱殷庆)
A: 正在分裂生长的 HeLa 细胞;B: CHO 单层细胞

般呈亚二倍体或非整倍体,失去接触抑制的细胞,容易传代培养。HeLa 细胞系(来自子宫颈瘤细胞)、BHK21(baby hamster kidney)细胞系与 CHO(chinese hamster ovary)细胞系等都是常用的细胞系。依靠这些细胞系做了大量卓有成效的工作。有关细胞系与细胞株的概念,也有人持相反的观点,认为能无限传代的细胞称细胞株。

体外培养的细胞,不论是原代细胞还是传代细胞一般不保持体内原有的细胞形态。但大体可以分为两种基本形态:成纤维样细胞(fibroblast like cell)与上皮样细胞(epithelial like cell)。此外还有一些可移动的游走细胞。

某些传代细胞还可用悬浮方法培养。其培养条件比较复杂,悬浮培养的最大优点是能同时获得大量细胞。

(二) 植物细胞培养

目前植物细胞培养主要有两大类型:

单倍体细胞培养:这种培养方法主要是用花药在人工培养基上进行培养。可以从小孢子(雄性生殖细胞)直接发育成胚状体,然后长成单倍体植株;或者通过愈伤组织诱导分化出芽和根,最终长成植株。单倍体细胞培养在植物育种中已取得了很大成就。

原生质体培养:一般用植物的体细胞(二倍体细胞),先经纤维素酶处理去掉细胞壁,去壁的细胞称为原生质体(protoplast)。原生质体在良好的无菌培养基中可以生长与分裂,经过诱导分化最终可长成植株。也可以通过不同植物的原生质体进行融合的体细胞杂交,由此而获得体细胞杂交的植株。转基因植物细胞的培养与分化的研究是植物基因工程的基础。

(三) 非细胞体系在细胞生物学研究中的作用

来源于细胞,而不具有完整的细胞结构,但包含了进行正常生物学反应所需的物质(如供能系统和酶反应体系等)组成的体系即为非细胞体系(cell-free system)。近年来,非细胞体系在研究 DNA 复制、RNA 转录、蛋白质合成、高尔基体的膜泡运输机制以及细胞核装配(包括染色质装配、核膜装配及核骨架的装配)

等方面显示了非常重要的作用。以非洲爪蟾卵提取物非细胞体系为例，来自非洲爪蟾的卵首先去胶膜后，经活化、裂解，然后超速离心，去掉上层脂质和下层卵黄、色素颗粒后剩下的提取物即是非细胞反应体系。向该体系中加入外源DNA，温育一段时间后即可重构出新的细胞核(图 3－15)。近年来，人们利用这一体系探讨了许多细胞生命活动中的重要问题，如细胞周期调控，核膜及染色质的装配，核质运输等。

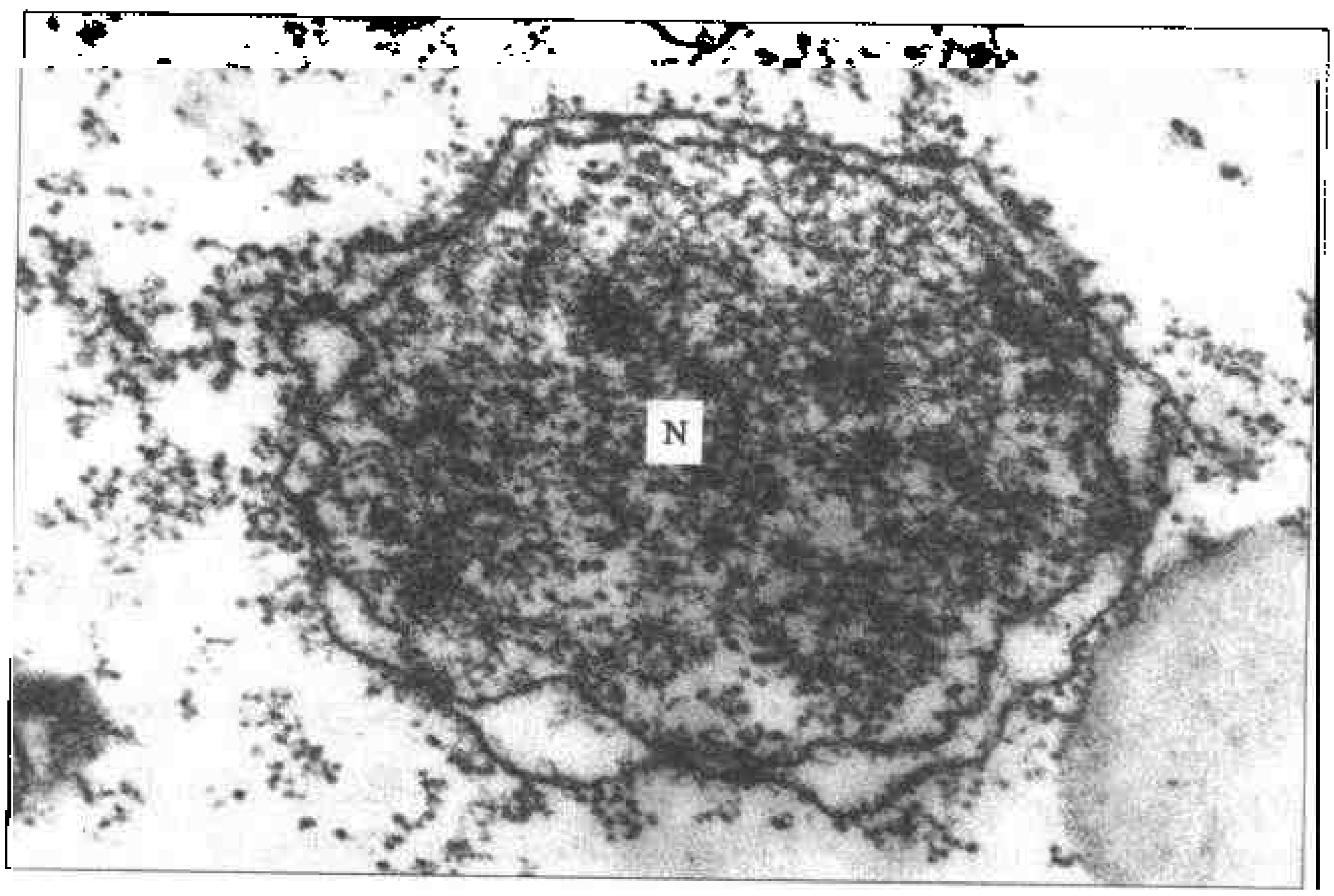


图 3－15　λDNA 在非洲爪蟾卵细胞提取物——非细胞体系中诱导形成细胞核(张博，翟中和等)

N：细胞核

二、细胞工程

细胞工程(cell engineering)是在细胞水平上的生物工程。细胞工程所使用的技术主要是细胞培养、细胞分化的定向诱导、细胞融合和显微注射等。通过细胞融合技术发展起来的单克隆抗体技术已取得了重大成就。细胞工程与基因工程结合，前景尤为广阔。

(一) 细胞融合与细胞杂交技术

两个或多个细胞融合成一个双核或多核细胞的现象称为细胞融合(cell fusion)。动物细胞融合一般要用灭活的病毒(如仙台病毒)或化学物质(如聚乙二醇，PEG)介导；植物细胞融合时，要先用纤维素酶去掉纤维素壁。

20 世纪 80 年代又发明了电融合技术(electronfusion method)。将悬浮细胞在低压交流电场(100～200 V/cm)中聚集成串珠状细胞群或将相互接触的单层培养细胞，加高压电脉冲促使融合。

细胞融合可以在基因型相同的细胞间进行，也可在基因型不同的种内细胞

间甚至种间细胞间进行。基因型相同的细胞形成的融合细胞称为同核融合细胞(homokaryon)；基因型不同的细胞形成的融合细胞称为异核融合细胞(heterokaryon)。含有两个核的同核融合细胞可通过同步有丝分裂产生含有一个异常大核的单核子细胞，其染色体数为正常数目的两倍，这些染色体是从原来两个核承袭而来的。通过细胞杂交形成的单核子细胞称为融合核细胞(synkaryon)。种间异核型融合细胞也可有繁殖能力。杂交细胞在培养过程中会发生染色体丢失现象。实验表明，在种内杂交的例子中，凡是亲本细胞亲缘关系比较近的，则所得的杂交细胞的核型比较稳定，在连续培养中染色体丢失的速度很慢。但在人、鼠杂交细胞中，人的染色体丢失很快。

(二）单克隆抗体技术

1975 年英国科学家 Milstein 和 Kohler 将产生抗体的淋巴细胞同肿瘤细胞融合，成功地建立了单克隆抗体(monoclonal antibody)技术，他们因此而获得 1984 年的诺贝尔医学和生理学奖。动物受到外界抗原刺激后可诱发免疫反应，产生相应的抗体，这一职能是由 B 淋巴细胞承担的；肿瘤细胞在体外培养条件下可以无限传代，是“永久”的细胞。Milstein 和 Kohler 为了大量制备纯一的单克隆抗体，他们设计的方法是：把小鼠骨髓瘤细胞与经绵羊红细胞免疫过的小鼠脾细胞(B淋巴细胞)在聚乙二醇或灭活的病毒的介导下发生融合。融合后的杂

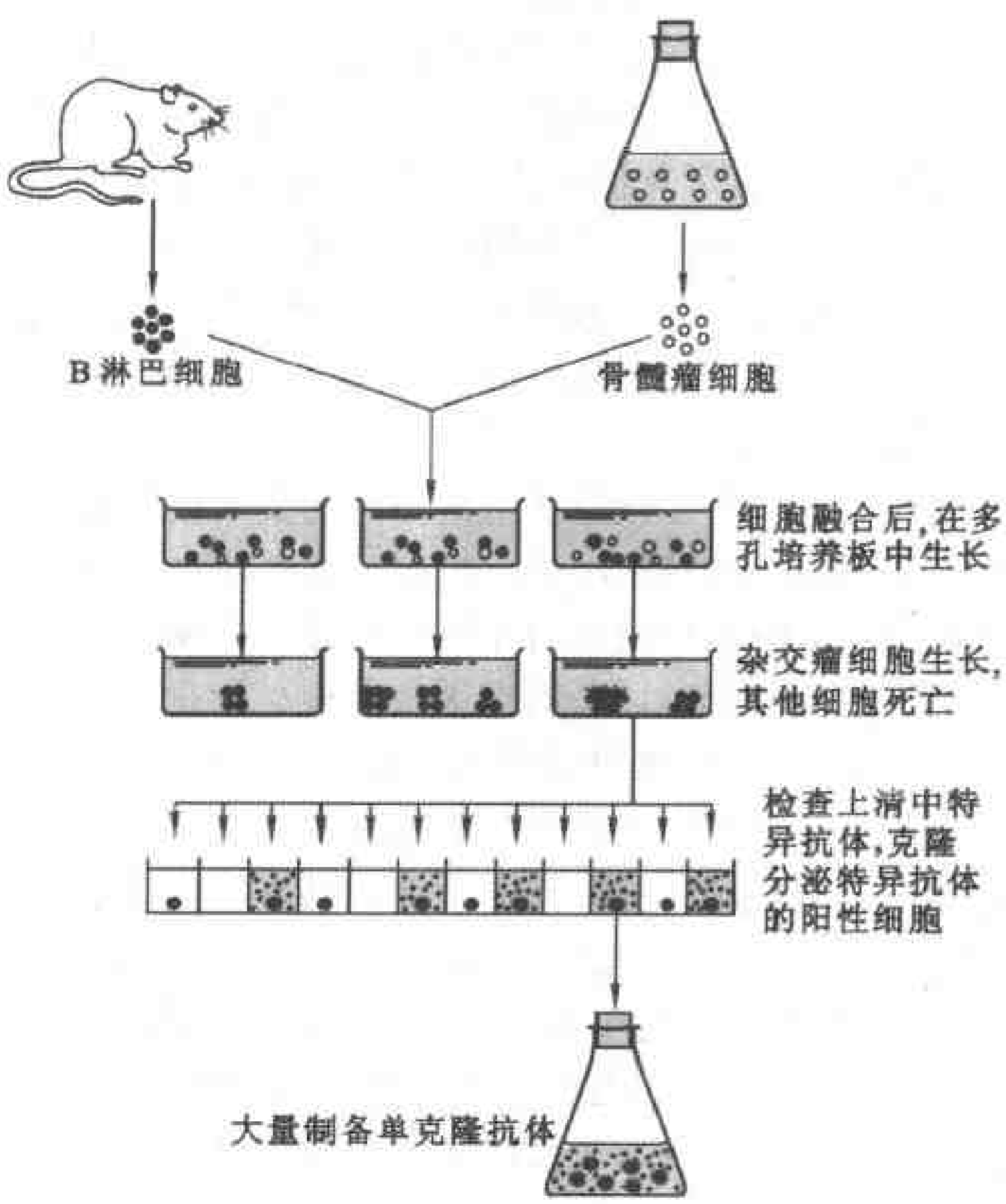


图 3-16 单克隆抗体制备过程示意图

交瘤细胞具有两种亲本细胞的特性,一方面可分泌抗绵羊红细胞的抗体,另一方面像肿瘤细胞一样,可在体外培养条件下或移植到体内无限增殖,从而分泌大量单克隆抗体。单克隆抗体的制备过程如图 3－16 所示。

单克隆抗体技术最主要的优点是可以用不纯的抗原分子制备纯一的单克隆抗体。其原因是,可以从产生各种不同抗体的各种杂交瘤混合细胞群体中筛选出产生特异抗体的杂交瘤细胞株。单克隆抗体技术与基因克隆技术相结合为分离和鉴定新的蛋白质和基因开辟了一条广阔途径。

(三)细胞拆合与显微操作技术

真核细胞是由细胞核和细胞质两大部分组成的,为了探明核质相互作用的机制,科学家们创建了细胞拆合技术。所谓细胞拆合就是把核与质分离开来,然后把不同来源的细胞质和细胞核相互配合,形成核质杂交细胞。

细胞拆合可以分为物理法和化学法两种类型。物理法就是用机械方法或短波光把细胞核去掉或使之失活,然后用微吸管吸取其他细胞的核,注入去核的细胞质中,组成新的杂交细胞。这种核移植必须用显微操作仪进行操作。化学法就是用松胞素 B(cytochalasin B)处理细胞,使细胞出现排核现象,再结合离心技术,将细胞分拆为核体(karyoplast)和胞质体(cytoplast)两部分。由于核体外表包有一层细胞膜和少量胞浆,因而在 PEG 或仙台病毒的介导下,核体可同另一胞质体融合,形成重组细胞(reconstituted cell)。显微操作技术(micromanipulation)是早期建立的一种胚胎学技术,即在显微镜下,用显微操作装置对细胞进行解剖和微量注射(microinjection)的技术。现在显微操作装置的设计越来越精密,不仅用于核移植,而且亦可对细胞核进行解剖和向核内注入基因。

细胞拆合、显微注射与现代分子生物学技术相结合使这些经典的胚胎学技术展现出极大的潜力,它不仅成为核质关系、细胞内某种 mRNA 或蛋白质功能等基础研究的重要手段,而且在转基因动物、高等动物克隆方面的理论与实践研究中取得重大的突破。

如前所述,显微镜和电子显微镜技术的建立与发展极大地开拓了人们的视野,发现了细胞内各种复杂的精细结构。然而对其成分的了解,特别是数以万计的基因及其表达产物的功能,以及它们在细胞代谢与细胞生长、分化、衰老、凋亡等生命活动的协同作用与调节机制,则更多地需要生物化学分析与分子生物学技术的应用——借助于当今迅速发展的功能基因组学(functional genomics)、蛋白质组学(proteomics)以及生物信息学(bioinformatics)(图 3－17);当然即使对各种基因及其产物的功能业已明了,而对生命活动本质的认识也还有相当的距离。但上述学科毕竟提供了揭示细胞生命活动所不可缺少的分子基础,其中所涉及的方法与途径也是解决细胞生物学中诸多难题的必由之路。所获得的大量有关信息是如何浓缩到小小的细胞中而成为生命活动的组成部分,从这一角度来看,细胞生物学的研究已成为对生命活动认识的瓶颈。

在细胞生物学研究中所涉及的大量技术细节可参阅有关参考书。这里需要再强调一下,在解决细胞生物学问题中应用最多、最为有效的途径——遗传分析

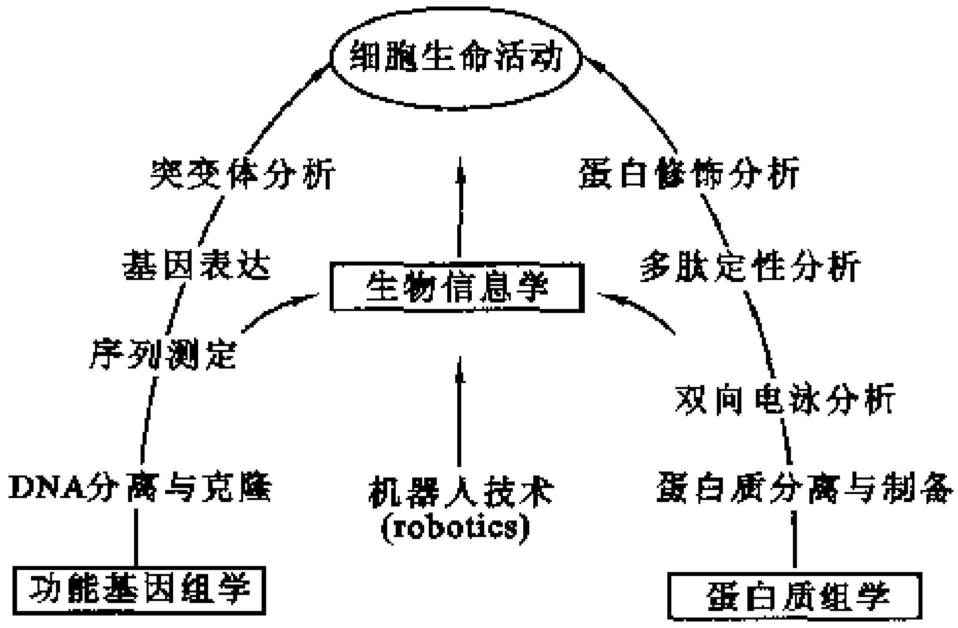


图 3-17　对细胞生命活动的研究成为当今生命科学发展的瓶颈

的方法。

经典遗传分析的方法是从表型到基因型的研究,从而了解特定基因在细胞中的功能。细胞生物学中很多知识都是通过这一方法获得的。如从人I细胞症发现了溶酶体酶分选途径。而更多的结果是通过对实验室各种突变体(mutant)的分析,如通过对酵母突变体的研究发现了细胞周期调节机制,对果蝇突变体研究发现控制体节分化的机制,而这些机制在整个多细胞有机体内部都相当保守。借此,从对某些实验生物模式的研究可以很快了解高等动物以及人的相关生物学机制。

从表型到基因型分析涉及大量实验生物突变株的诱变,这一工作随机性强,因而工作量极大。基因克隆与转基因技术的发展使由基因型到表型的研究成为可能。结合大量应用的基因剔除(knock out)与基因插入(knock in)等技术,人们可用所谓反求遗传学即从基因型到表型的分析来了解某一基因产物在细胞乃至整个生命体中的功能。尽管这些技术还不能完全令人满意地解决细胞生命中的诸多问题,但毕竟这是一个重要且目前尚不可替代的实验手段。

在运用已有的实验技术进行细胞生物学研究的同时,对实验技术进行必要的改进是非常重要的。由于实验条件不同,可以说运用好任何一项实验技术都不仅仅是简单的重复,在此基础上如果能改进或建立新的实验方法和研究模式,其本身就是一项具有创造性的研究工作,它将有可能对本学科的研究产生更大的影响。这种例子即使在科学落后的古代中国也是不胜枚举的。

提　　要

细胞生物学研究方法是细胞生物学不断向前发展的重要推动力量。本章首先介绍了细胞形态结构的观察方法:普通复式显微镜技术是光镜下观察细胞结构的基础,荧光显微镜技术与现代图像处理技术相结合在蛋白质与核酸等生物大分子的定性与定位方面发挥了重要作用,活体细胞则可以用相差显微镜及微

分干涉显微镜观察，录像增差显微镜技术在一定程度上可以填补光镜与电镜之间分辨率上的间隙；超薄切片技术是观察细胞超微结构的基础，根据观察的需要还可以采取一些特殊的样品制备方法；扫描电镜技术则是观察细胞表面形貌的有力工具；扫描隧道显微镜技术在纳米生物学的研究领域具有独特的优越性。细胞组分的分离与纯化可以用超速离心等技术；成分分析与细胞结构观察的结合便产生了细胞化学技术、免疫荧光技术、免疫电镜技术、原位杂交技术等；同位素标记技术结合放射自显影可以研究多种生物大分子在细胞内的动态变化。

细胞培养技术是生命科学的研究基础，也是当今细胞工程乃至基因工程的应用基础。目前基于体外细胞培养，特别是干细胞的培养与定向分化的诱导技术的发展，人们已有可能在体外构建组织甚至器官，并由此建立了组织工程（tissue engineering），同时在细胞治疗及其与基因治疗相结合的应用中也显示出诱人的前景。目前该技术已成功地应用于皮肤移植和骨髓干细胞的移植。

值得指出的是，当今生物学各学科之间的交叉性较强，特别是在研究方法上，所以除了本章介绍的一些方法外，其他实验技术，如基因操作技术、各种生物化学技术、生理学技术、微生物学技术和遗传学技术等也常应用于细胞生物学，特别是在细胞分子生物学的研究中，更需各种技术的巧妙结合。

思　考　题

1. 举 2～3 例说明电子显微镜技术与细胞分子生物学技术的结合在现代细胞生物学研究中的应用。

2. 光学显微镜技术有哪些新发展？它们各有哪些突出优点？为什么电子显微镜不能完全代替光学显微镜？

3. 为什么说细胞培养是细胞生物学研究的最基本技术之一？

参 考 文 献

1. 翟中和主编．细胞生物学．北京：高等教育出版社，1995

2. Julio E celic. Cell Biology: A Laboratory Handbook. Denmark: Academic Press Inc., 1994

3. Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Whiley and Sons Inc., 1996

4. David L. Spector *et al*. Cells: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998

5. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. New York: John Whiley and Sons Inc., 1999

第四章

细胞膜与细胞表面

第一节　细胞膜与细胞表面特化结构

细胞膜(cell membrane)又称质膜(plasma membrane),是指围绕在细胞最外层,由脂质和蛋白质组成的生物膜。

细胞膜不仅是细胞结构上的边界,使细胞具有一个相对稳定的内环境,同时在细胞与环境之间进行物质、能量的交换及信息传递过程中也起着决定性的作用。

真核细胞内部存在着由膜围绕构建的各种细胞器。细胞内的膜系统与细胞膜统称为生物膜(biomembrane),它们具有共同的结构特征,因此本节对质膜结构与功能的阐述亦有助于对整个生物膜的结构与功能有一个基本的了解。

一、细胞膜的结构模型

人们用光学显微镜发现了细胞,但在此后的几百年里却从未见到细胞膜。在很长一段时间,甚至怀疑细胞是否有一个确切的边界结构。20 世纪 50 年代初,在电镜下显示出了质膜的超微结构。但人们并未感到惊奇,因为在此几十年前细胞生理学家在研究细胞内渗透压时就已证明了质膜的存在。

1925 年 E.Gorter 和 F.Grendel 用有机溶剂抽提人的红细胞膜的膜脂成分并测定膜脂单层分子在水面的铺展面积,发现它为红细胞表面积的二倍,提示了质膜是由双层脂分子构成的。随后,人们发现质膜的表面张力比油－水界面的表面张力低得多,已知脂滴表面如吸附有蛋白成分则表面张力降低,因此 Davson 和 Danielli 推测,质膜中含有蛋白质成分并提出"蛋白质－脂质－蛋白质"的三明治式的质膜结构模型(图 4－2A)。这一模型影响达 20 年之久。

1959 年,J.D.Robertson 发展了三明治模型,提出了单位膜模型(unit membrane model),并大胆地推断所有的生物膜都由蛋白质－脂质－蛋白质的单位膜构成,这一模型得到 X 射线衍射分析与电镜观察结果的支持。如当用高锰酸钾

或锇酸固定细胞时，电镜超薄切片中细胞膜显示出暗—亮—暗三条带，两侧的暗带厚度约 2 nm，推测是蛋白质，中间亮带厚度约 3.5 nm，推测是脂双层分子，整个膜的厚度约 7.5 nm(图 4－1)。随后的一些实验，如免疫荧光标记技术等证明，质膜中的蛋白质是可流动的，冷冻蚀刻技术显示了双层膜脂中存在膜蛋白颗粒。

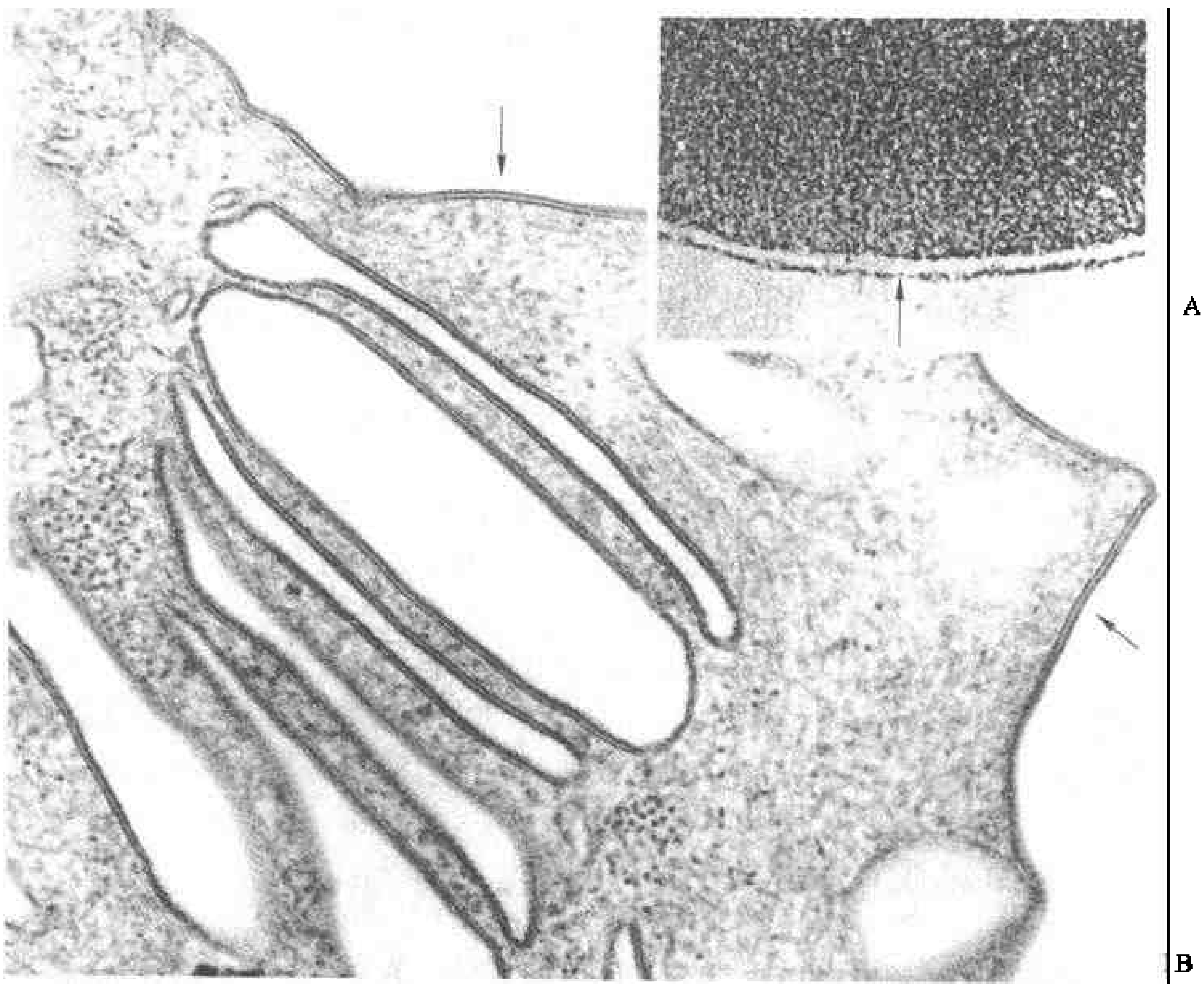


图 4－1　电镜超薄切片技术显示的细胞膜结构(梁凤霞，丁明孝)

A：红细胞膜(箭头)，中间亮带厚约 3.5 nm，两侧暗带厚约 2 nm(J D Robertson)；B：电镜超薄切片显示的小鼠膀胱上皮细胞膜(箭头)，及胞质中囊泡膜

在此基础上，S.J.Singer 和 G.Nicolson 于 1972 年提出了生物膜的流动镶嵌模型(fluid mosaic model)(图 4－2B)。这一模型随即得到各种实验结果的支持。流动镶嵌模型主要强调：① 膜的流动性，膜蛋白和膜脂均可侧向运动；② 膜蛋白分布的不对称性，有的镶在膜表面，有的嵌入或横跨脂双分子层。随着实验技术的改进及认识的不断深入，还有学者提出强调生物膜的膜脂处于无序(流动性)和有序(晶态)之间动态转变的“液晶态模型”以及强调生物膜是由具有流动性程度不同的“板块”镶嵌而成的“板块镶嵌模型”等。事实上，这些模型都可以看作是对流动镶嵌模型的充实、完善或补充。

最近有人提出脂筏模型(lipid rafts model)，即在生物膜上胆固醇富集而形

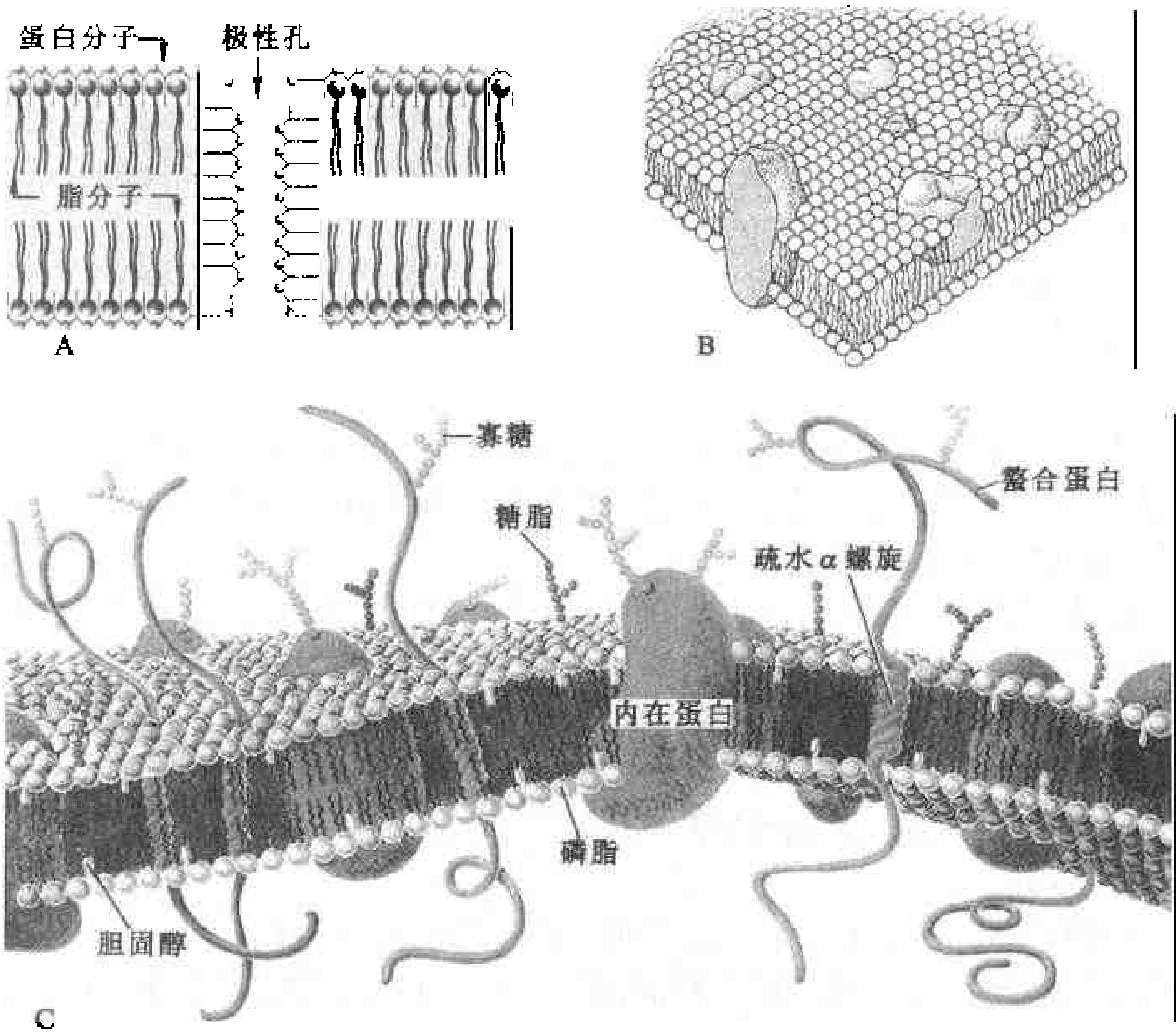


图 4－2 生物膜的模型

A：三明治式的质膜结构模型；B：流动镶嵌模型(引自 Singer，1972)；C：生物膜结构示意图(引自 Karp，1999)

成有序脂相，如同"脂筏"一样载着各种蛋白，脂筏最初可能在内质网上形成，转运到细胞膜上后，有些脂筏可在不同程度上与膜下细胞骨架蛋白交联。推测一个 100 nm 大小的脂筏可载有 600 个蛋白分子。这一模型可解释生物膜的某些性质与功能，但仍需要更多的证据。

目前对生物膜结构的认识可归纳如下(图 4－2C)：

(1) 具有极性头部和非极性尾部的磷脂分子在水相中具有自发形成封闭的膜系统的性质，以疏水性非极性尾部相对，极性头部朝向水相的磷脂双分子层是组成生物膜的基本结构成分，尚未发现在生物膜结构中起组织作用的蛋白。

(2) 蛋白分子以不同的方式镶嵌在脂双层分子中或结合在其表面，蛋白的类型，蛋白分布的不对称性及其与脂分子的协同作用赋予生物膜具有各自的特性与功能。

(3) 生物膜可看成是蛋白质在双层脂分子中的二维溶液。然而膜蛋白与膜脂之间、膜蛋白与膜蛋白之间及其与膜两侧其他生物大分子的复杂的相互作用，在不同程度上限制了膜蛋白和膜脂的流动性。

二、膜脂

膜脂是生物膜的基本组成成分，每个动物细胞膜上约有 10^9 个脂分子，即每平方微米的质膜上约有 5×10^6 个脂分子。

（一）成分

膜脂主要包括磷脂、糖脂和胆固醇 3 种类型。

1. 磷脂

磷脂构成了膜脂的基本成分，约占整个膜脂的 50% 以上。磷脂又可分为两类：甘油磷脂和鞘磷脂。甘油磷脂包括磷脂酰胆碱（卵磷脂）、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇等。

组成生物膜的磷脂分子的主要特征是：① 具有一个极性头和两个非极性的尾（脂肪酸链），但存在于线粒体内膜和某些细菌质膜上的心磷脂除外，它具有 4 个非极性的尾部；② 脂肪酸碳链为偶数，多数碳链由 16，18 或 20 个碳原子组成；③ 除饱和脂肪酸根外（如软脂酸），还常常有不饱和脂肪酸（如油酸），不饱和脂肪酸多为顺式，顺式双键在烃链中产生约 30°的弯曲。

2. 糖脂

糖脂普遍存在于原核和真核细胞的细胞膜上，其含量约占膜脂总量的 5% 以下，在神经细胞膜上糖脂含量较高，约占 5% ～10%。目前已发现 40 余种糖脂，不同的细胞中所含糖脂的种类不同。如神经细胞的神经节苷脂质，人红细胞表面的 ABO 血型糖脂都具有重要的生物学功能。

在动物细胞中，糖脂与鞘磷脂相似，都是鞘氨醇的衍生物。在糖脂中，一个或多个糖残基（而不是磷脂酰胆碱）与鞘氨醇骨干的伯羟基连接。最简单的糖脂是脑苷脂类，只有一个葡萄糖或半乳糖残基，较复杂的神经节苷脂可含多达 7 个糖残基，其中含有不同数目的唾液酸。

3. 胆固醇和中性脂质

存在于真核细胞膜上，其含量一般不超过膜脂的 1/3。胆固醇在调节膜的流动性，增加膜的稳定性以及降低水溶性物质的通透性等都起着重要作用。细菌质膜中不含有胆固醇成分，但某些细菌的膜脂中含有甘油脂等中性脂质。

（二）膜脂的运动方式

膜脂分子有 4 种热运动的方式：

1. 沿膜平面的侧向运动

其扩散速率为 $10^{-8}cm^2/s$，相当于每秒移动 2 μm 的距离。由于侧向运动产生分子间的换位，其交换频率在 10^6 次/s 以上。侧向运动是膜脂分子的基本运动方式，具有重要的生物学意义。

2. 脂分子围绕轴心的自旋运动。

3. 脂分子尾部的摆动

脂肪酸链靠近极性头部的摆动较小，尾部摆动较大。X 射线衍射分析显示，

在距头部第 9 个碳原子以后的脂肪酸链已由较为有序变成无序状态，有些可能折叠形成“小结”，这有助于解释极性的水分子比较容易通过细胞膜的现象。

4．双层脂分子之间的翻转运动

一般情况下翻转运动极少发生，其发生频率还不到脂分子侧向交换频率的 10^{-10}。研究人工膜上脂分子运动所得到的结果与以支原体、细菌和红细胞膜为材料所得到的结果类似，但脂分子的翻转运动在细胞某些膜系统中发生的频

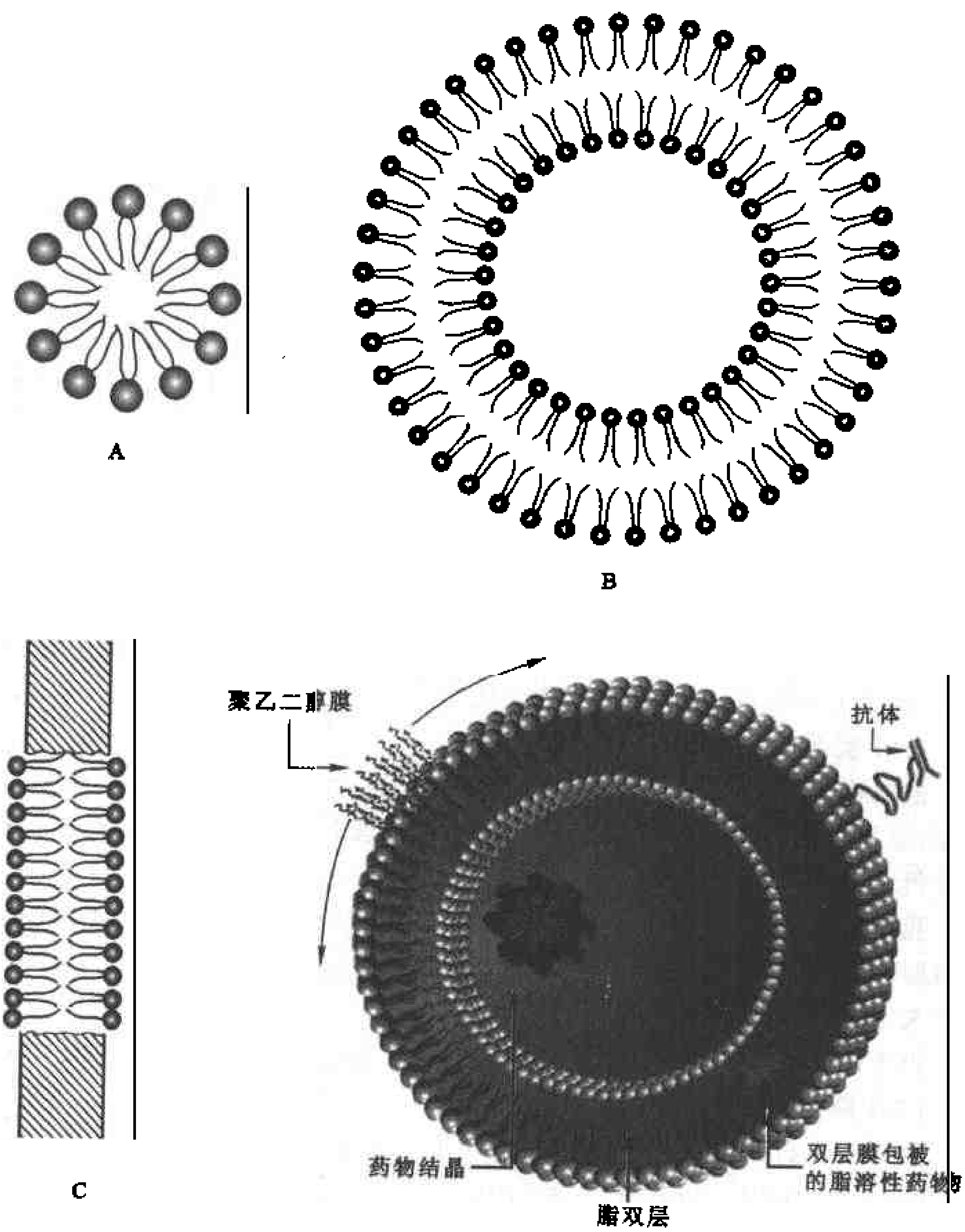


图 4－3　水溶液中的磷脂分子团(A)、球形脂质体(B)、平面脂质体膜(C)和用于疾病治疗的脂质体(D)的示意图

率很高，特别是在内质网膜上，新合成的磷脂分子经几分钟后，将有半数从双层脂分子的一侧通过翻转运动转向另一侧。

脂分子的运动不仅与脂分子的类型有关，也与脂分子同膜蛋白及膜周围的生物大分子之间的相互作用以及温度等环境条件有关。

（三）脂质体

脂质体（liposome）是根据磷脂分子可在水相中形成稳定的脂双层膜的趋势而制备的人工膜。单层脂分子铺展在水面上时，其极性端插入水相而非极性尾部面向空气界面，搅动后形成乳浊液，即形成极性端向外而非极性端在内部的脂分子团或形成双层脂分子的球形脂质体（图 4－3B）。

球形脂质体直径为 25～1 000 nm 不等，控制形成条件可获得大小均一的脂质体，同样的原理还可以制备平面的脂质体膜（图 4－3C）。

脂质体可用不同的膜脂来制备，同时还可以嵌入不同的膜蛋白，因此脂质体是研究膜脂与膜蛋白及其生物学性质的极好实验材料。脂质体中裹入 DNA 可用于基因转移。

在临床治疗中，脂质体也有诱人的应用前景。脂质体中裹入不同的药物或酶等具有特殊功能的生物大分子，可望诊断与治疗多种疾病（图 4－3D）。特别是脂质体技术与单抗及其他技术结合，可使药物更有效地作用于靶细胞以减少对机体的损伤。

三、膜蛋白

动物细胞主要有 9 种膜脂，而膜蛋白的种类繁多，多数膜蛋白分子数目较少，但却赋予细胞膜非常重要的生物学功能。

（一）类型

根据膜蛋白分离的难易及其与脂分子的结合方式，膜蛋白可分为两大基本类型：膜周边蛋白（peripheral proteins）或称外在膜蛋白（extrinsic proteins）和膜内在蛋白（integral proteins）或称整合膜蛋白（图 4－4）。

膜周边蛋白为水溶性蛋白，靠离子键或其他较弱的键与膜表面的蛋白质分子或脂分子结合，因此只要改变溶液的离子强度甚至提高温度就可以从膜上分离下来，膜结构并不被破坏。

膜内在蛋白与膜结合非常紧密，只有用去垢剂使膜崩解后才可分离出来。

（二）膜内在蛋白与膜脂结合的方式

膜内在蛋白多数为跨膜蛋白（transmembrane proteins），也有些插入脂双层中，它与膜结合的主要方式有（图 4－5）：

1. 膜蛋白的跨膜结构域与脂双层分子的疏水核心的相互作用。

2. 跨膜结构域两端携带正电荷的氨基酸残基，如精氨酸、赖氨酸等与磷脂分子带负电的极性头形成离子键，或带负电的氨基酸残基通过Ca^{2+}、Mg^{2+}等阳离子与带负电的磷脂极性头相互作用。

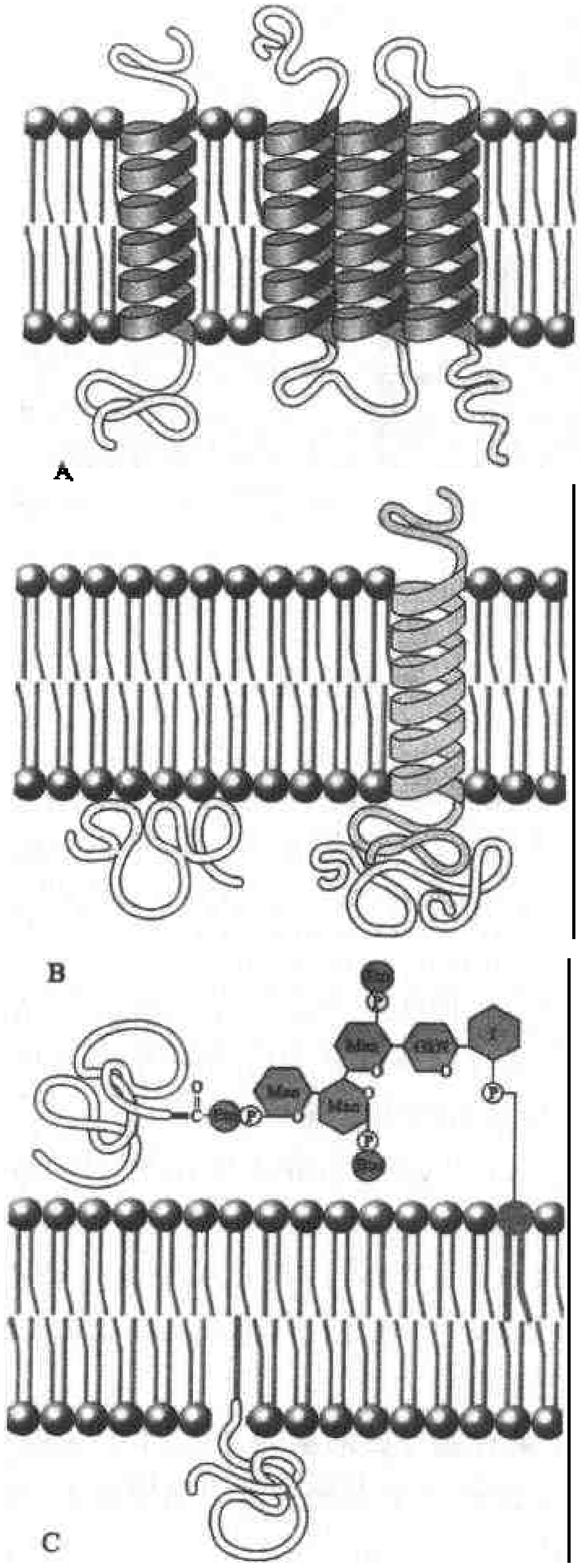


图 4-4 膜蛋白的基本类型

A：膜内在蛋白；B：膜周边蛋白；C：脂分子或糖脂连接的膜蛋白

3. 某些膜蛋白在细胞质基质一侧的半胱氨酸残基上共价结合脂肪酸分子，插入脂双层之间，进一步加强膜蛋白与脂双层的结合力(图 4-5)，还有少数蛋白与糖脂共价结合。膜内在蛋白跨膜结构域是与膜脂结合的主要部位，具体作用方式如下：

(1) 跨膜结构域含有 20 个左右的疏水氨基酸残基，形成 α 螺旋(长度约 3

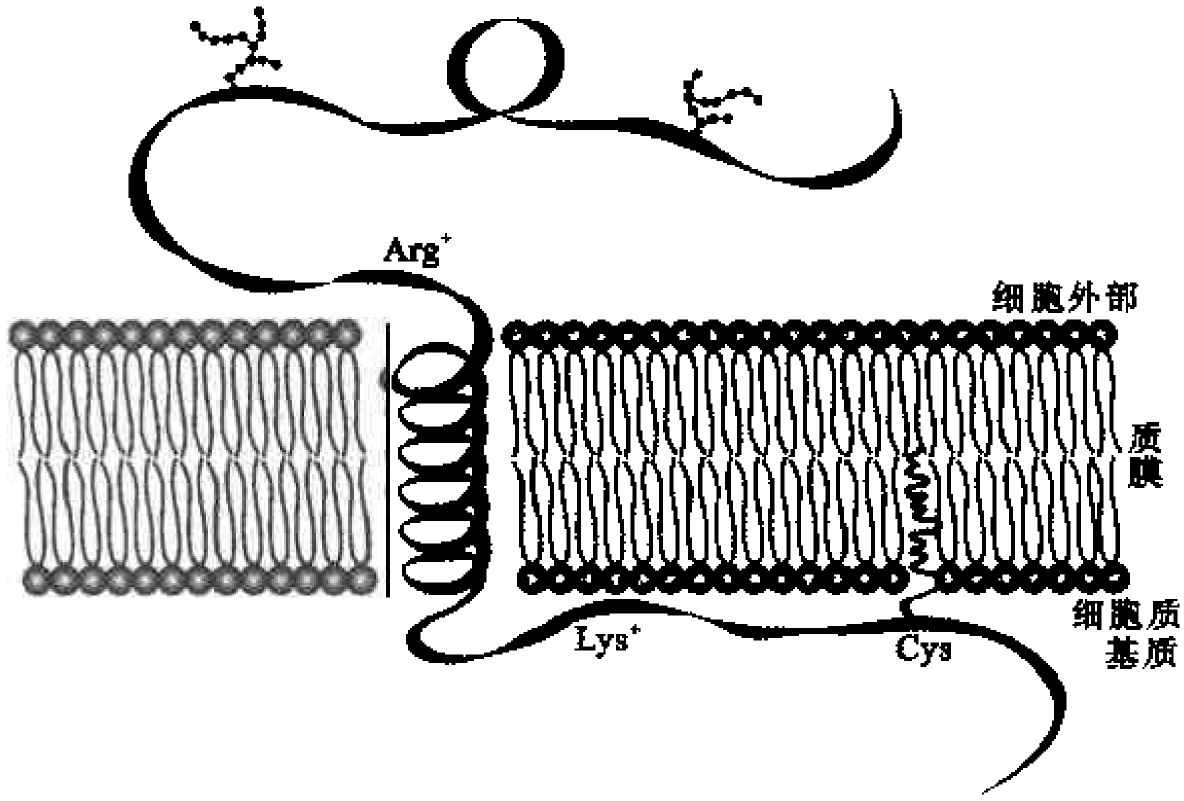


图 4－5　膜蛋白与膜脂结合方式示意图

nm 左右)，其外部疏水侧链通过范德华力与脂双层分子脂肪酸链(厚度约 3.2 nm)相互作用。第一个被证明跨膜结构域为 α 螺旋的膜蛋白是嗜盐菌(*Halobacterium halobium*)的膜蛋白，其跨膜的 α 螺旋约由 21 个氨基酸组成，这种 α 螺旋可能是多数跨膜蛋白共同的结构特征。

(2) 某些 α 螺旋既具有极性侧链又具有非极性侧链，α 螺旋的外侧是非极性链，内侧是极性链，形成特异极性分子的跨膜通道。如人红细胞膜上的 Band Ⅲ蛋白，它介导 Cl^-/HCO_3^- 的跨膜运输。

(3) 某些跨膜蛋白，如大肠杆菌外膜上的孔蛋白(porins)和线粒体内膜上的孔蛋白，其跨膜结构域常常仅有 10～12 个氨基酸残基，形成 β 折叠片结构。α 螺旋中相邻二个氨基酸残基的轴向距离为 0.15 nm，而在 β 折叠片中为 0.35 nm。反向平行的 β 折叠片相互作用形成非特异的跨膜通道，可允许相对分子质量小于 10^4 的小分子自由通过。

目前虽然已克隆了多种膜蛋白的基因，但由于其难以形成晶体，因而对其结构分析除 X 射线衍射技术外，主要是应用低温电镜技术。根据其二维晶体，推导出三维结构(图 4－6)。

(三) 去垢剂

去垢剂(detergent)是一端亲水一端疏水的两性小分子，是分离与研究膜蛋白的常用试剂。去垢剂可分离子型去垢剂和非离子型去垢剂两类。

常用的离子型去垢剂如十二烷基磺酸钠(SDS)，其分子式如下：

$$CH_3—(CH_2)_{11}—O—\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle O}{\|}}{S}}—ONa$$

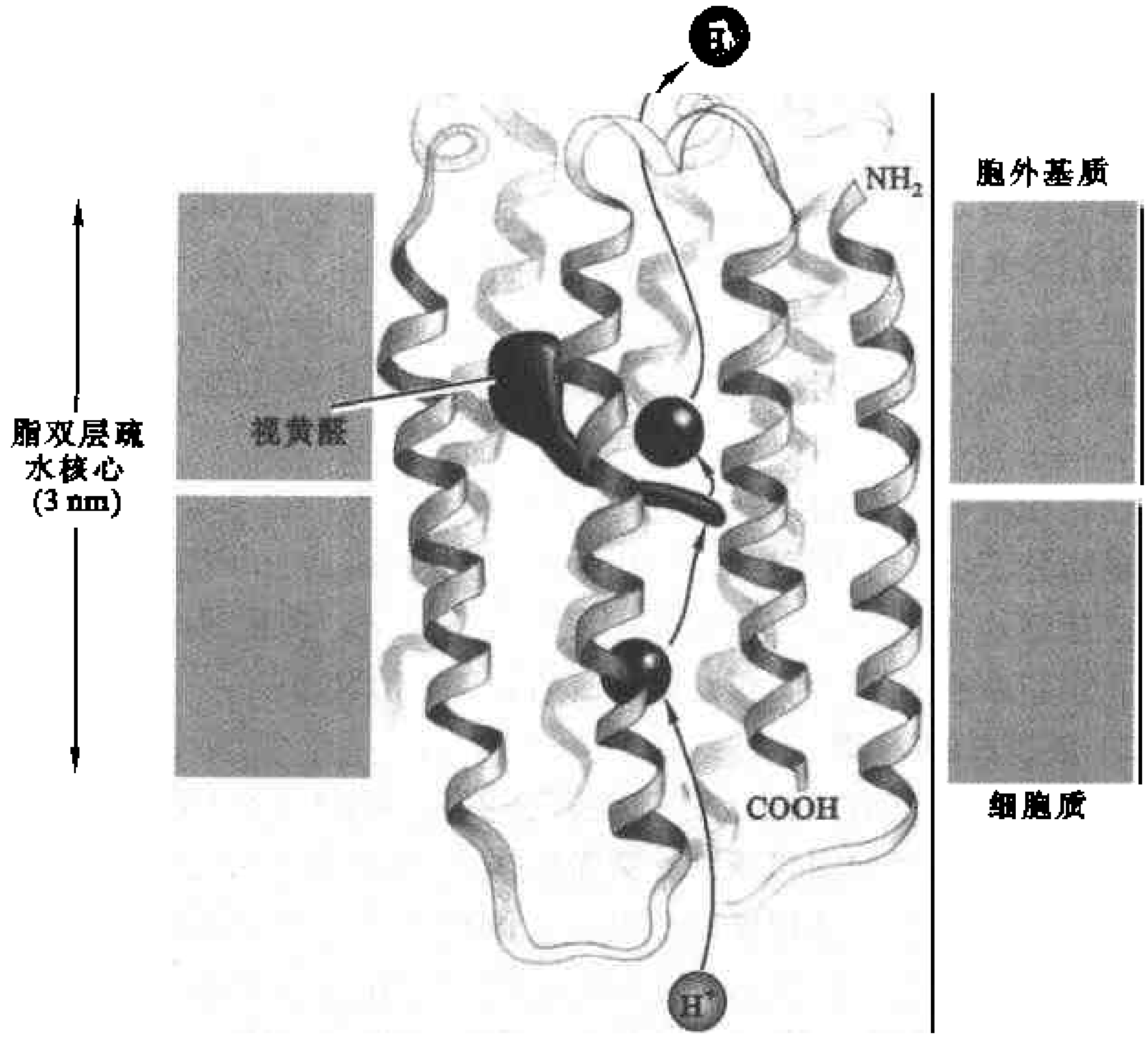


图 4－6　细菌紫膜质(bacteriorhodopsin)分子的三维结构

它是一个跨膜 7 次的膜蛋白，其中两个极性的氨基酸侧链(球状体)可能与质子的转移有关

它不仅可使细胞膜崩解，并与膜蛋白疏水部分结合使其分离，而且还可以破坏蛋白内部的非共价键，甚至改变亲水部分的构象。

由于 SDS 对蛋白质的作用较为剧烈，引起蛋白质变性，因此在纯化膜蛋白时，特别是为获得有生物活性的膜蛋白时，常采用非离子去垢剂。

常用的非离子去垢剂 Triton X－100 分子式如下：

$$C(CH_3)_3—CH_2—C(CH_2)_2—C_6H_4—O—(CH_2)_2—O—[CH_2—CH_2—O]_n—H$$

$$n = 8 \sim 9$$

非离子去垢剂也可使细胞膜崩解，但对蛋白质的作用比较温和，它不仅用于膜蛋白的分离与纯化，也用于除去细胞的膜系统，以便对细胞骨架蛋白和其他蛋白进行研究。

四、膜的流动性

膜的流动性是生物膜的基本特征之一，也是细胞进行生命活动的必要条件。

（一）膜脂的流动

膜脂的流动性主要指脂分子的侧向运动，它在很大程度上是由脂分子本身的性质决定的，一般来说，脂肪酸链越短，不饱和程度越高，膜脂的流动性越大。温度对膜脂的运动有明显的影响，各种膜脂都具有其不同的相变温度，在生物膜中膜脂的相变温度是由组成生物膜的各种脂分子的相变温度决定的。

膜脂的流动性是生长细胞完成多种生理功能所必需的，在细菌和动物细胞中常常通过增加不饱和脂肪酸的含量来调节膜脂的相变温度以维持膜脂的流动性。

在动物细胞中，胆固醇对膜的流动性也起着重要的调节作用。胆固醇分子既有与磷脂分子相结合限制其运动的作用，也有将磷脂分子隔开使其更易流动的作用。最终效应取决于上述两种作用的综合效果。多数情况下，胆固醇的作用是防止膜脂由液相变为固相以保证膜脂处于流动状态。

（二）膜蛋白的流动

一系列的实验证明，膜蛋白的流动性，荧光抗体免疫标记实验就是其中一个典型的例子。用抗鼠细胞膜蛋白的荧光抗体（显绿色荧光）和抗人细胞膜蛋白的荧光抗体（显红色荧光）分别标记小鼠和人的细胞表面，然后用灭活的仙台病毒处理使两种细胞融合。10 min 后不同颜色的荧光在融合细胞表面开始扩散，40 min 后已分辨不出融合细胞表面绿色荧光或红色荧光区域，如加上不同的滤光片则显示红色荧光或绿色荧光都均匀地分布在融合细胞表面，这一实验清楚地显示了与抗体结合的膜蛋白在质膜上的运动。

如果用药物抑制细胞能量转换、蛋白质合成等代谢途径，对膜蛋白运动没有影响，但是如果降低温度，则膜蛋白的扩散速率可降低至原来的 1/20～1/10。实验表明，膜蛋白在脂双层二维溶液中的运动是自发的热运动，不需要细胞代谢产物的参加，也不需提供能量。

在某些细胞中，当荧光抗体标记时间继续延长，已均匀分布在细胞表面的标记荧光会重新排布，聚集在细胞表面的某些部位，即所谓成斑现象（patching），或聚集在细胞的一端，即成帽现象（capping）。成斑现象和成帽现象进一步显示了膜蛋白的流动性。对这两种现象的解释是二价的抗体分子交联相邻的膜蛋白分子，同时也与膜蛋白和膜下骨架系统的相互作用以及质膜与细胞内膜系统之间膜泡运输相关。

实际上，并不是所有的膜蛋白都像在人鼠融合细胞膜上那样自由运动，在极性的细胞中，质膜蛋白被某些特殊的结构限定在细胞表面的某个区域，甚至在单细胞生物草履虫的细胞膜上膜蛋白的分布也具有特定的区域性。有些细胞 90％的膜蛋白是自由运动的，而有些细胞只有 30％的膜蛋白处于流动状态，原因之一是某些膜蛋白与膜下细胞骨架结构相结合，限制了膜蛋白的运动。用阻断微丝形成的药物松胞素 B 处理细胞后，膜蛋白的流动性大大增加。

用非离子去垢剂处理细胞使细胞膜系统崩解，多数膜蛋白流失，但仍有部分膜蛋白结合在细胞骨架上。细胞骨架不但影响膜蛋白的运动，也影响其周围的

膜脂的流动。膜蛋白与膜脂分子的相互作用也是影响膜流动性的重要因素。

(三) 光脱色恢复技术

光脱色恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 是研究膜蛋白或膜脂流动性的基本实验技术之一。用荧光素标记膜蛋白或膜脂，然后用激光束照射细胞表面某一区域，使被照射区的荧光淬灭变暗。由于膜的流动性，淬灭区域的亮度逐渐增加，最后恢复到与周围的荧光强度相等。根据荧光恢复的速度可推算出膜蛋白或膜脂扩散速率，如质膜上的膜蛋白扩散速率为 $5\times10^{-11}cm^2/s \sim 5\times10^{-9}cm^2/s$，而蛋白质在水溶液中的扩散速率为 $10^{-7}cm^2/s$，要比膜蛋白大 100～10 000 倍，显然脂分子与蛋白分子及蛋白分子之间的相互作用束缚了膜蛋白的扩散。

五、膜的不对称性

(一) 细胞膜各部分的名称

与细胞外环境接触的膜面称质膜的细胞外表面(extrocytoplasmic surface, ES)，与细胞质基质接触的膜面称质膜的原生质表面(protoplasmic surface, PS)。冷冻蚀刻技术制样过程中，膜结构常常从双层脂分子疏水端断裂，这样又产生了质膜的细胞外小页断裂面(extrocytoplasmic face, EF)和原生质小页断裂面(protoplasmic face, PF)(图 4－7)。

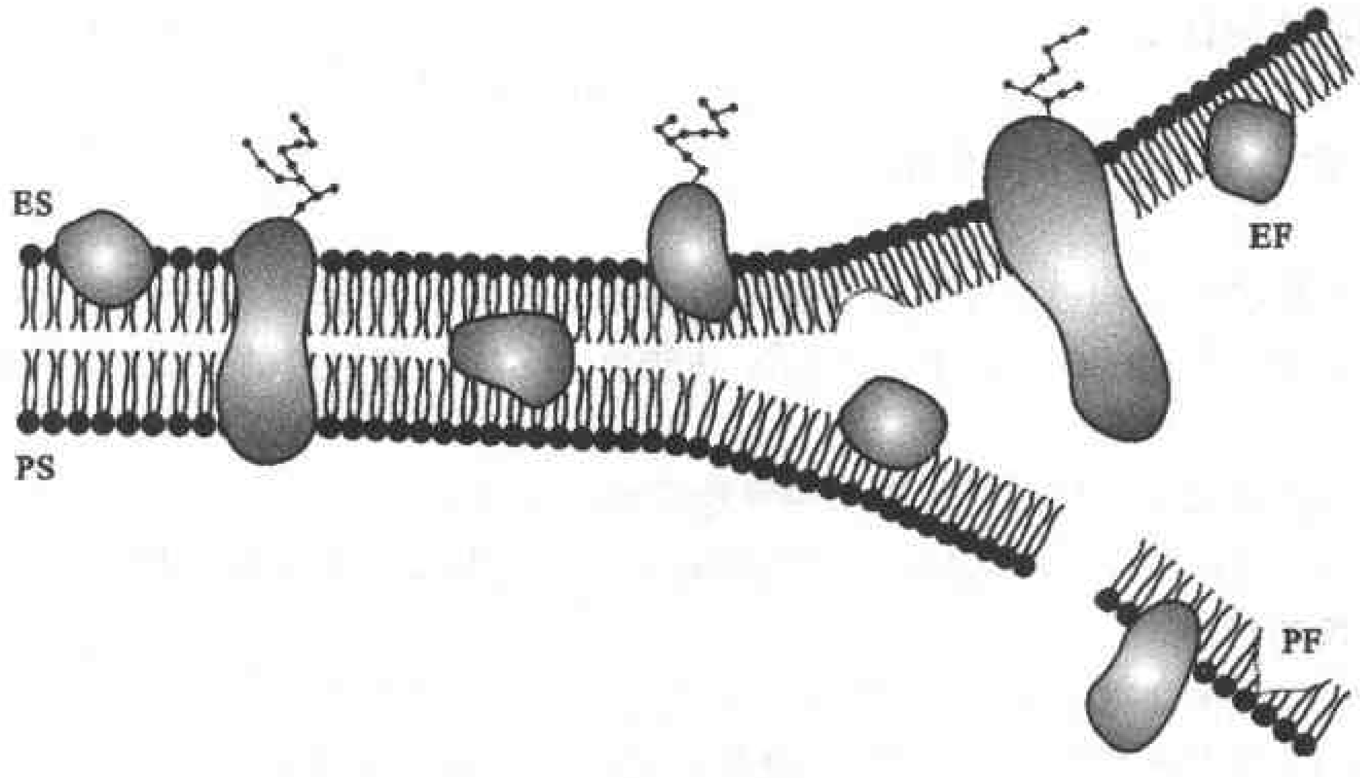


图 4－7　生物膜各膜面的名称(右侧为冷冻断裂复型技术所显示的两个断裂面，即 EF 面和 PF 面)

细胞内的膜系统也根据类似的原理命名，如细胞内的囊泡，与细胞质基质接触的膜面为它的 PS 面，而与囊泡腔内液体接触的面为 ES 面。

（二）膜脂的不对称性

膜脂的不对称性是指同一种膜脂分子在膜的脂双层中呈不均匀分布（图4－8）。糖脂的分布表现出完全不对称性，其糖侧链都在质膜的ES面上，因此糖脂仅存在于质膜的细胞外小页中。糖脂的不对称分布是完成其生理功能的结构基础。磷脂分子不对称分布的生物学意义还不清楚，有人推测可能与膜蛋白的不对称分布有关。

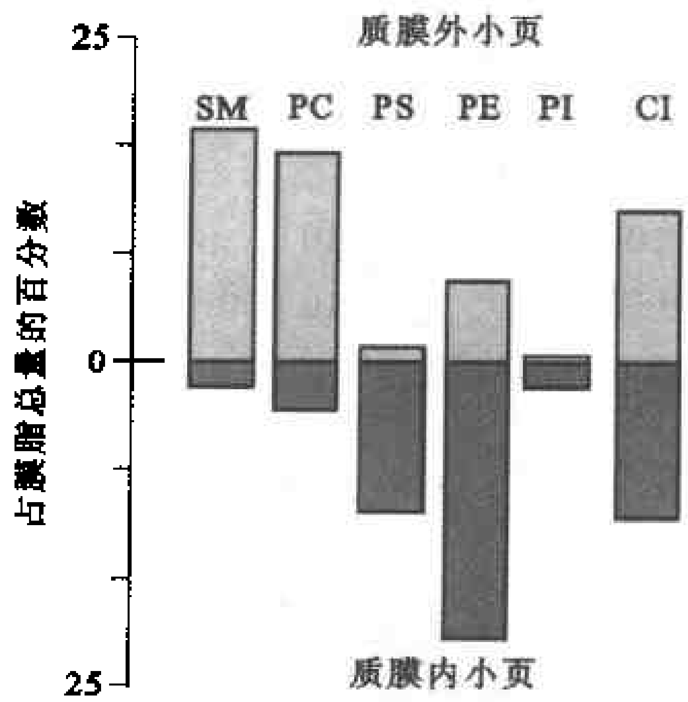


图4－8　磷脂在红细胞膜上的分布

SM：鞘磷脂 PC：卵磷脂 PS：磷脂酰丝氨酸 PE：磷脂酰乙醇胺 PI：磷脂酰肌醇 CI：胆固醇

（三）膜蛋白的不对称性

所有的膜蛋白，不论是膜周边蛋白还是膜内在蛋白在质膜上都呈不对称分布。与膜脂不同，膜蛋白的不对称性是指每种膜蛋白分子在细胞膜上都具有明确的方向性。如细胞表面的受体、膜上载体蛋白等，都是按一定的方向传递信号和转运物质，与细胞膜相关的酶促反应也都发生在膜的某一侧面，特别是质膜上的糖蛋白，其糖残基均分布在质膜的ES面。各种生物膜的特征及其生物学功能主要是由膜蛋白来决定的。膜蛋白的不对称性是生物膜完成复杂的在时间与空间上有序的各种生理功能的保证。

六、细胞膜的功能

生物膜的结构模型与生物学特征也基本适于细胞膜，但要指出的是，细胞膜作为细胞内外边界，其结构更为复杂，功能更为多样。细胞膜的主要功能概括如下：

（1）为细胞的生命活动提供相对稳定的内环境；

（2）选择性的物质运输，包括代谢底物的输入与代谢产物的排除，其中伴随着能量的传递；

（3）提供细胞识别位点，并完成细胞内外信息跨膜传递；

（4）为多种酶提供结合位点，使酶促反应高效而有序地进行；

（5）介导细胞与细胞、细胞与基质之间的连接；

（6）质膜参与形成具有不同功能的细胞表面特化结构。

质膜的功能将在后面几节详细阐述。

七、骨架与细胞表面的特化结构

细胞膜常常与膜下结构(主要是细胞骨架系统)相互联系，协同作用，并形成细胞表面的某些特化结构以完成特定的功能。这些特化结构包括膜骨架(membrane associated cytoskeleton)、鞭毛和纤毛、微绒毛及细胞的变形足等等，分别与细胞形态的维持、细胞运动、细胞的物质交换等功能有关。其基本结构与功能将在第十章详细阐述。因此本节仅介绍有关膜骨架的一些知识。

(一) 膜骨架

膜骨架是指细胞膜下与膜蛋白相连的由纤维蛋白组成的网架结构,它参与维持细胞膜的形状并协助质膜完成多种生理功能。光镜下人们曾发现细胞膜下存在约 0.2μm 厚的溶胶层,电镜出现以后,人们才逐渐认识到膜下溶胶层的实质,其中含有丰富的细胞骨架纤维(如微丝、微管等)，这些骨架纤维通过膜骨架与质膜相连。迄今为止，对膜骨架研究最多的还是哺乳动物的红细胞。

(二) 红细胞的生物学特性

红细胞负责把 O_2 从肺运送到体内各组织,同时把细胞代谢产生的 CO_2 运回肺中。哺乳动物成熟的红细胞没有细胞核和内膜体系,所以红细胞的质膜是最简单最易操作的生物膜。正常情况下,红细胞呈双凹型的椭球结构,直径约 7 μm(图 4－9A)，但它可以通过直径比自身更小的毛细血管。在其平均寿命约 120 天的期间内红细胞往返于动脉和静脉达几百万次,行程约 480 km 而不破损,这就需要红细胞的质膜既有良好的弹性又具有较高强度。红细胞膜的这些特性在很大程度上是由膜骨架赋予的。红细胞的质膜与膜骨架蛋白比较容易纯化、分析。当细胞经低渗处理后,质膜破裂,同时释放出血红蛋白和其他胞内可溶性蛋白。这时红细胞仍然保持原来的形状和大小,这种结构称为血影(图 4－9B)。因此红细胞为研究质膜的结构及其与膜骨架的关系提供了理想的材料。

(三) 红细胞质膜蛋白及膜骨架

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析血影的蛋白成分显示:红细胞膜蛋白主要包括血影蛋白或称红膜肽(spectrin)、锚蛋白(ankyrin)、带 3 蛋白、带 4.1 蛋白和肌动蛋白(actin)，但此外还有一些血型糖蛋白(glycophorin)(图 4－9C)。改变处理血影的离子强度,则血影蛋白和肌动蛋白条带消失,说明这两种蛋白不是膜内在蛋白,比较容易除去,此时血影的形状变得不规则,膜蛋白的流动性增强,说明这两种蛋白在维持膜的形状及固定其他膜蛋白的位置方面起重要作用。若用去垢剂 TritonX－100 处理血影,这时带 3 蛋白及一些血型糖蛋白消失,但血影仍能维持原来的形状,说明带 3 蛋白及血型糖蛋白是膜整合蛋白,在维持细胞形态上并不起决定性作用。

带 3 蛋白是红细胞膜上 Cl^-/HCO_3^- 阴离子转运的载体蛋白,每个细胞中约有 120 万个分子。与血型糖蛋白不同，它由两个相同的链组成二聚体,每条链含有 929 个氨基酸,在质膜中穿越 12～14 次，形成跨膜 α 螺旋。带 3 蛋白的 N

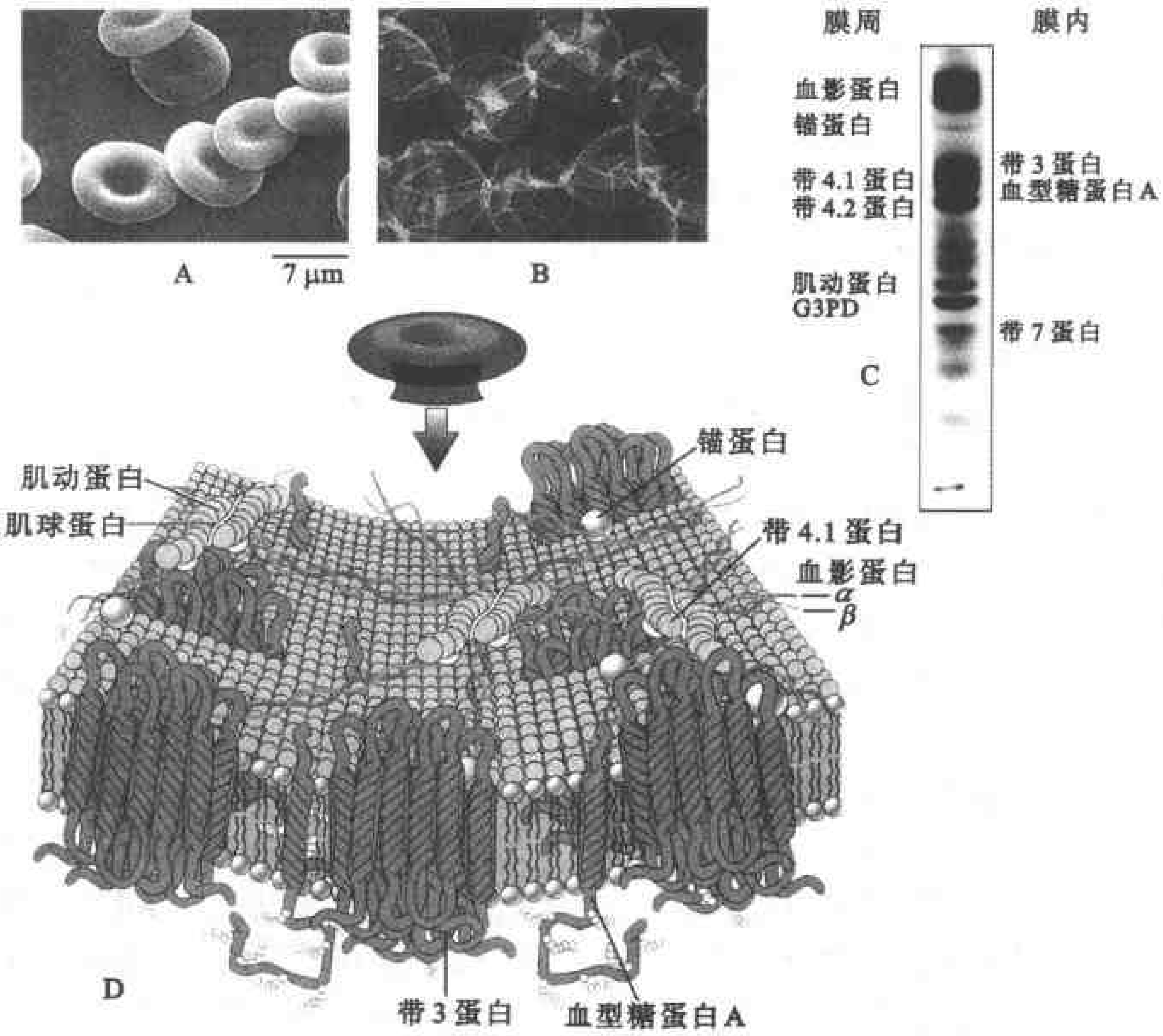


图 4-9　红细胞的形态及其膜骨架的主要成分

A：人红细胞扫描电镜照片；B：红细胞血影；C：聚丙烯酰胺凝胶电泳对血影成分分析；D：血影蛋白、肌动蛋白、锚蛋白和带 4.1 蛋白的相互关系及其与膜蛋白——带 3 蛋白的结合

端伸向细胞质基质面折叠成不连续的水不溶性的区域，为膜骨架蛋白提供结合位点。那么红细胞膜骨架是如何构成的呢？它与膜蛋白是什么关系呢？血影经非离子去垢剂处理后，所有的脂质和血型糖蛋白及大部分带 3 蛋白都被溶去，存留的部分即是纤维状的膜骨架蛋白网络及部分与之结合的膜内在蛋白，因此血影的形状仍能保持。膜骨架蛋白主要成分包括血影蛋白、肌动蛋白、锚蛋白和带 4.1 蛋白等(图 4-9D)。

血影蛋白由 α 链和 β 链组成一个二聚体，长约 100 nm，直径约 5 nm，两个二聚体头与头相连形成一个长度为 200 nm 的四聚体，血影蛋白在体外溶液中就可以聚合。每个红细胞约含有 10 万个血影蛋白四聚体。与血影蛋白四聚体游离端相连的肌动蛋白纤维链长约 35 nm，其中包含 13 个肌动蛋白单体和一个长 35 nm 的原肌球蛋白分子(由两个多肽组成，每个多肽相对分子质量为 35×10^3)。因为肌动蛋白纤维的长度与原肌球蛋白分子的长度相同，所以认为原肌球蛋白决定了肌动蛋白纤维的长度。纯化的血影蛋白与肌动蛋白纤维结合力非常微弱，带 4.1 蛋白和 adducin 的作用大大加强了肌动蛋白与血影蛋白的结合。由于肌动蛋白纤维上存在多个(一般为 5 个左右)与血影蛋白结合的位点，所以

可以形成一个网络状的膜骨架结构。

膜骨架网络与细胞膜之间的连接主要通过锚蛋白。每个红细胞中约有10万个锚蛋白分子。每个血影蛋白四聚体上平均有一个锚蛋白分子。锚蛋白含有两个功能性结构域:一个能紧密地而且特异地与血影蛋白β链上的一个位点相连;另一个结构域与带3蛋白中伸向胞质面的一个位点紧密结合,从而使血影蛋白网络与细胞膜连接在一起。此外,带4.1蛋白还可以与血型糖蛋白的细胞质结构域(C端)或带3蛋白结合,同样也起到使膜骨架与质膜蛋白相连的作用。膜骨架的组织及其与细胞膜膜内在蛋白的关系如图4-9D所示。

红细胞膜的刚性与韧性主要由质膜蛋白与膜骨架复合体的相互作用来实现,但其双凹型圆盘结构的形成还需要其他的骨架纤维参与。在红细胞中还存在着少量短纤维状的肌球蛋白纤维,它可能与两个或更多的肌动蛋白纤维相结合并将它们拉到一起,以维持红细胞的形态。

除红细胞外,已发现在其他细胞中也存在与锚蛋白、血影蛋白及带4.1蛋白类似的蛋白质,推测也存在膜骨架结构,与红细胞不同,这些细胞具有较发达的胞质骨架体系,而且细胞膜功能更为复杂,所以有关其他细胞中膜骨架的结构与功能还有待进一步研究。

第二节　细胞连接

细胞连接是多细胞有机体中相邻细胞之间通过细胞质膜相互联系,协同作用的重要组织方式。根据行使功能的不同,细胞连接可分为三大类:

(1) 封闭连接(occluding junctions)中紧密连接(tight junction)是典型代表,它将相邻细胞的质膜密切地连接在一起阻止溶液中的分子沿细胞间隙渗入体内。

(2) 锚定连接(anchoring junctions)通过细胞骨架系统将细胞与相邻细胞或细胞与基质之间连接起来。根据直接参与细胞连接的骨架纤维的性质不同,锚定连接又分为与中间纤维相关的锚定连接和与肌动蛋白纤维相关的锚定连接。前者包括桥粒(desmosome)和半桥粒(hemidesmosome);后者主要有粘着带(adhesion belt)和粘着斑(focal adhesion)。

(3) 通讯连接(communicating junctions)主要包括间隙连接(gap junction)、神经细胞间的化学突触(chemical synapse)和植物细胞中的胞间连丝(plasmodesmata)。

一、封闭连接

紧密连接是封闭连接的主要形式,一般存在于上皮细胞之间,在光镜下小肠上皮细胞之间的闭锁堤区域便是紧密连接存在的部位。紧密连接可阻止可溶性物质从上皮细胞层一侧扩散到另一侧,因此起重要的封闭作用,同时还将上皮细

胞的游离端与基底面细胞膜上的膜蛋白相互隔离，以行使其各自不同的膜功能，因此紧密连接还具有隔离和一定的支持功能。

电镜观察显示，紧密连接处的相邻的细胞膜紧紧地靠在一起，没有间隙，似乎融合在一起。冷冻断裂复型技术显示出它是由围绕在细胞四周的焊接线网络而成。焊接线也称嵴线，一般认为它由成串排列的特殊跨膜蛋白组成，相邻细胞的嵴线相互交联封闭了细胞之间的空隙(图 4－10)。将含有重金属元素的化合物氢氧化镧溶液注入胰腺腺泡细胞的一侧，电镜显示，它不能通过细胞间的紧密连接。有些上皮细胞间的紧密连接甚至可阻止水分子通过。上皮细胞层对小分子的封闭程度直接与嵴线的数量有关，如肾小管上皮细胞之间紧密连接的嵴线只有 1～2 条，胰腺腺泡细胞为 3～4 条，而小肠上皮细胞多达 6 条以上，这显然与上皮细胞层的内外环境及其所行使的功能密切相关。有些实验表明，上皮细胞还可调节紧密连接对水及其溶质的通透性。

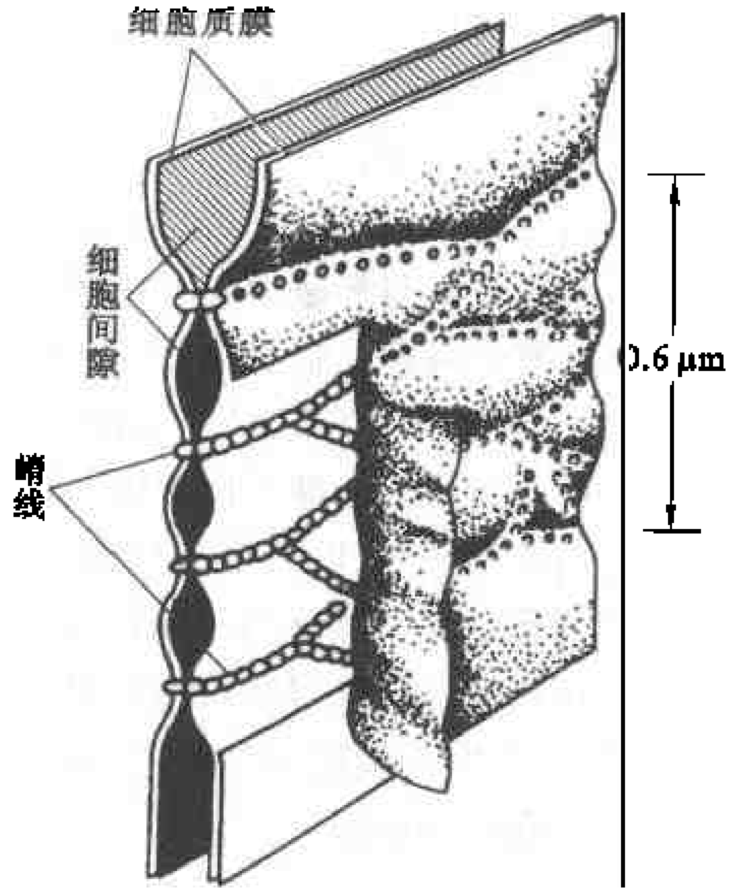


图 4－10　紧密连接模式图
两个相邻细胞的细胞膜通过嵴线紧紧靠在一起

目前从紧密连接的嵴线中至少分离出两类蛋白：一类称封闭蛋白(occludin)，相对分子质量为 60×10^3 的跨膜 4 次的膜蛋白；另一类称 claudin，也是跨膜 4 次的蛋白家族(现已发现 15 种以上)。occludin 和 claudins 如何形成嵴线，是否还有其他蛋白参与嵴线的形成，尚有待于进一步的研究。

二、锚定连接

锚定连接在机体组织内分布很广泛，在上皮组织、心肌和子宫颈等组织中含量尤为丰富。通过锚定连接将相邻细胞的骨架系统或将细胞与基质相连形成一个坚挺、有序的细胞群体。锚定连接具有两种不同的形式：① 与中间纤维相连的锚定连接主要包括桥粒和半桥粒；② 与肌动蛋白纤维相连的锚定连接主要包括粘着带与粘着斑。

构成锚定连接的蛋白可分成两类：① 细胞内附着蛋白(attachment proteins)，将特定的细胞骨架成分(中间纤维或微丝)同连接复合体结合在一起；② 跨膜连接的糖蛋白，其细胞内的部分与附着蛋白相连，细胞外的部分与相邻细胞的跨膜连接糖蛋白相互作用或与胞外基质相互作用。

(一) 桥粒与半桥粒

桥粒在两个细胞之间形成钮扣式的结构将相邻细胞铆接在一起,同时桥粒也是细胞内中间纤维的锚定位点(图4-11)。细胞质内的中间纤维通过桥粒相互连接形成贯穿于整个组织的整体网络,支持该组织并抵抗外界压力与张力。电镜下桥粒处相邻细胞膜间的间隙约30 nm,在质膜的胞质面有一块厚度为15~20 nm的盘状致密斑,中间纤维直接与其相连;相邻两细胞的致密斑由跨膜连接糖蛋白相互连接。与桥粒相连的中间纤维的成分依不同细胞类型而不同:上皮细胞中是角蛋白中间纤维;心肌细胞中为结蛋白中间纤维;大脑表皮细胞中为波形蛋白纤维。有证据表明,不同组织来源的桥粒复合体的化学组成也有所不同。半桥粒在形态上与桥粒类似,但功能和化学组成不同。它通过细胞膜上的膜蛋白-整联蛋白将上皮细胞固着在基底膜(basement membrane)上,在半桥粒中,中间纤维不是穿过而是终止于半桥粒的致密斑内。

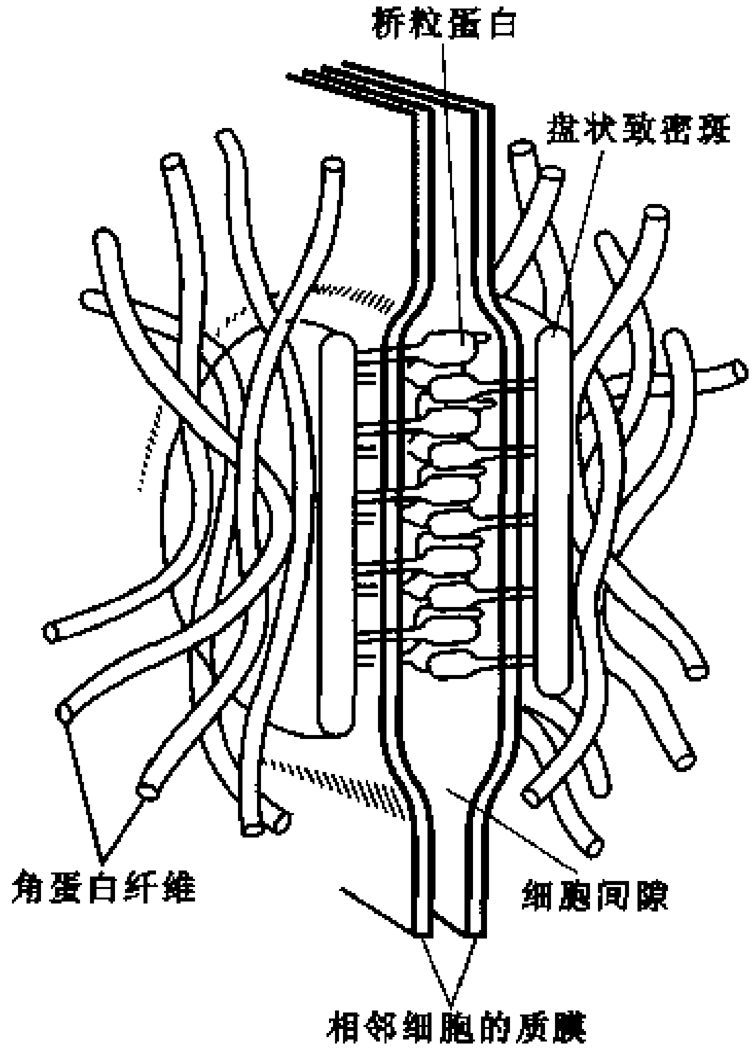


图4-11 桥粒结构模式图

(二) 粘着带与粘着斑

粘着带位于某些上皮细胞紧密连接的下方,相邻细胞间形成一个连续的带状结构。粘着带处的相邻细胞膜的相互作用依赖于Ca^{2+},因此粘着带中的跨膜连接糖蛋白被认为是钙粘素家族。粘着带处相邻细胞膜的间隙约15~20 nm,介于紧密连接和桥粒之间,所以粘着带也被称为中间连接或带状桥粒(belt desmosome)。但从结构上看,与粘着带相连的纤维并不是中间纤维而是肌动蛋白纤维。与粘着带相连的微丝在细胞中形成平行于细胞膜的可收缩的纤维束。小肠上皮细胞微绒毛中的肌动蛋白纤维束就结合在与粘着带相连的纤维网络上(图4-12)。

粘着斑是肌动蛋白纤维与细胞外基质之间的连接方式。体外培养的成纤维细胞通过粘着斑贴附在瓶壁上。在粘着斑处,跨膜连接糖蛋白行使纤连蛋白受体的功能,并通过纤连蛋白与胞外基质结合,跨膜连接糖蛋白的细胞内结构域则通过某些微丝结合蛋白与肌动蛋白纤维结合。粘着斑和粘着带均起着细胞附着与支持的功能。在粘着斑形成过程中,GTP结合蛋白Rho激酶起着关键的调节作用,图4-13示涉及多种因子参加的粘着斑装配的模式图。

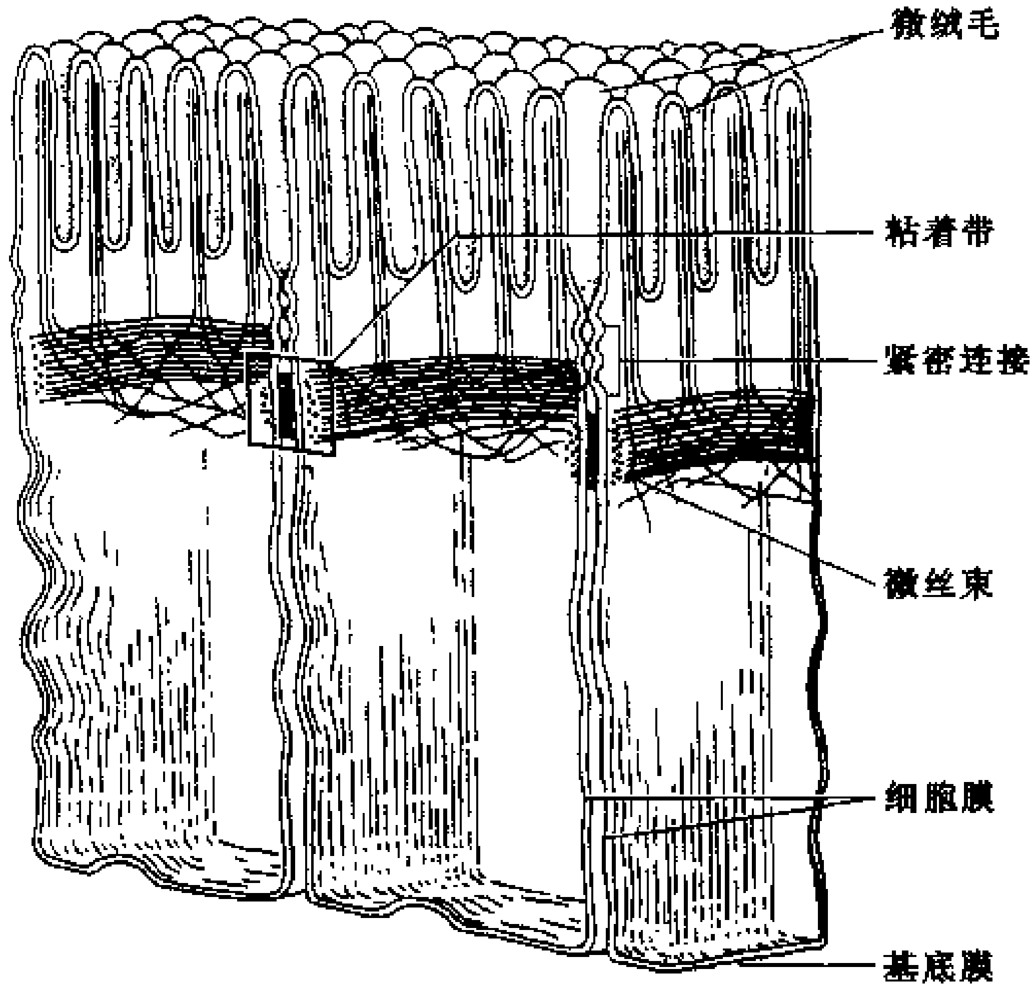


图 4－12 小肠上皮细胞之间的粘着带示意图

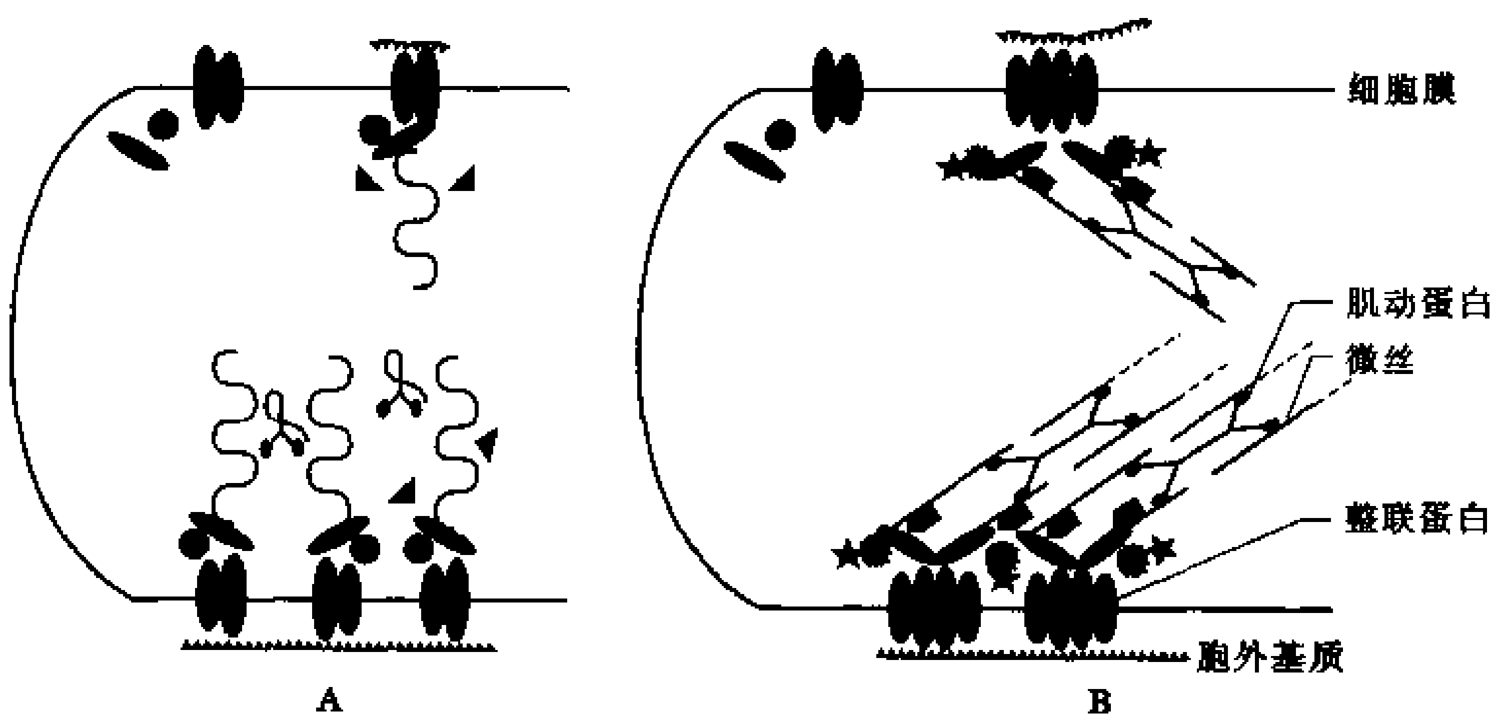


图 4－13 粘着斑装配前(A)及装配后(B)的示意图

三、通讯连接

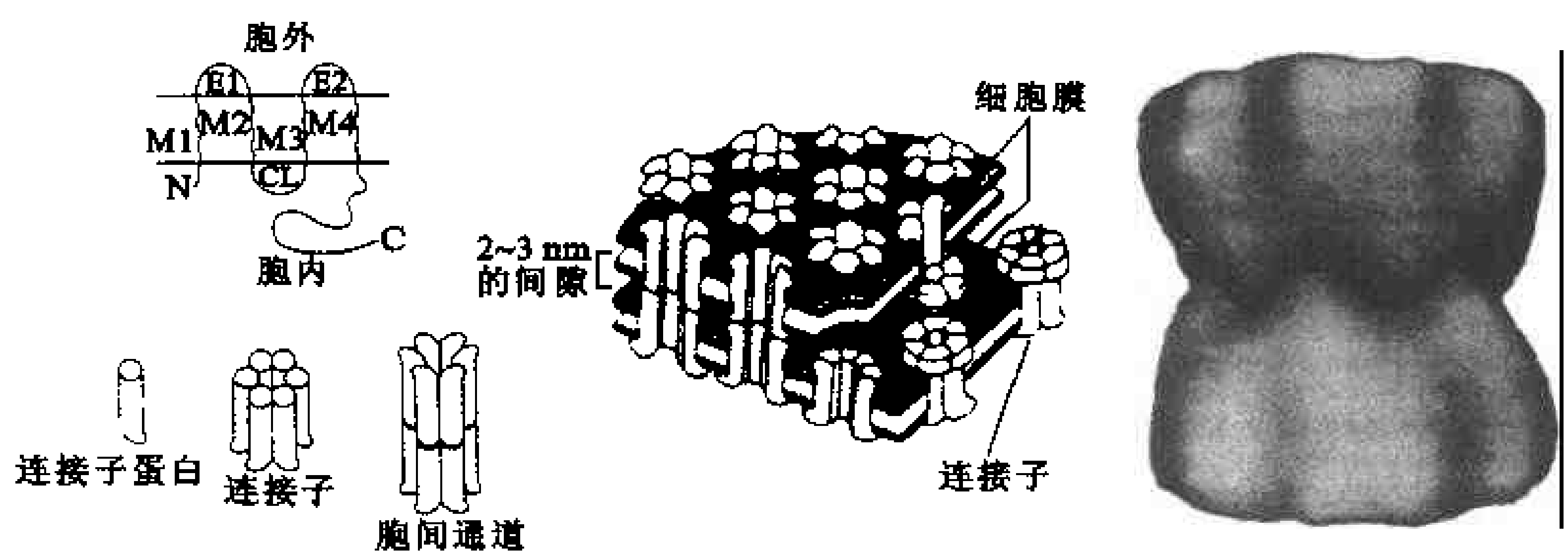
(一) 间隙连接

间隙连接分布非常广泛,几乎所有的动物组织中都存在间隙连接。不同细胞的间隙连接单位由几个到 10^5 个不等。

1. 结构与成分

间隙连接处相邻细胞膜间的间隙为 2～3 nm(图 4－14),间隙连接的名称由此而来。构成间隙连接的基本单位称连接子(connexon)。每个连接子由 6 个相

同或相似的跨膜蛋白亚单位 connexin 环绕，中心形成一个直径约 1.5 nm 的孔道。相邻细胞膜上的两个连接子对接便形成一个间隙连接单位，因此间隙连接也称缝隙连接或缝管连接。许多间隙连接单位往往集结在一起，其区域大小不一，最大直径可达 0.3 μm，因此可以用密度梯度离心技术将质膜上的间隙连接区域的膜片分离出来。目前已从不同动物或不同组织中分离出 20 余种构成连接子的蛋白，它们属于同一类蛋白家族，其相对分子质量从 26×10^3 至60×10^3 不等，如肝细胞间隙连接中分离出来的 C32，即相对分子质量为 32×10^3 的连接子蛋白，它较一般蛋白更能够抗去垢剂抽提和蛋白酶的消化，所以比较容易纯化。连接子蛋白具有 4 个 α 螺旋的跨膜区，这也是该蛋白家族最保守的区域。所有已测序的近 20 种连接子蛋白的一级结构都比较保守，其氨基酸序列具有相似的亲水性与疏水性分布，并有相似的抗原性。然而不同类型细胞表达不同的连接子蛋白（多数细胞表达 1 种或几种），它们所装配的间隙连接的孔径与调控机制可能有所不同。



A　　B　　C

图 4－14　间隙连接模式图

A：连接子蛋白具有 4 个跨膜结构域（M1－M4）及胞质一侧（CL）和胞外一侧（E1 和 E2）形成三个环状突起以及 N 端与 C 端；B：6 个连接子蛋白形成一个连接子，相邻细胞的连接子对接形成间隙连接；C：电镜三维重构技术显示，连接子对接模型，相应的二个连接子通过 30°的旋角而紧密地结合在一起

2．功能及其调节机制

早在 1958 年，人们就发现了与间隙连接有关的细胞与细胞间的通讯，然而 10 年以后才真正将电镜下看见的间隙连接与细胞通讯联系起来。最初的实验是在细胞内插入微电极，加上电压后发现有电流产生，说明一些无机盐离子可以自由地从细胞间隙连接处由一个细胞进入相邻的另一个细胞。此后，通过向细胞内注射分子量不同的染料，证明间隙连接的通道可以允许相对分子质量小于 1×10^3 的分子通过，这表明细胞内的小分子，如无机盐离子、糖、氨基酸、核苷酸和维生素等有可能通过间隙连接的孔隙，而蛋白质、核酸、多糖等生物大分子一般不能通过。

(1) 间隙连接在代谢偶联中的作用

间隙连接能够允许小分子代谢物和信号分子通过，是细胞间代谢偶联的基础。代谢偶联现象在体外培养细胞中已得到证实，例如：缺乏胸苷激酶的突变细胞株，不能利用胸苷合成DNA。将突变细胞与正常的含有胸苷激酶的细胞一起培养，两种细胞相互接触并可形成间隙连接，此时向培养液中加入放射性标记的胸苷，结果显示放射性标记的胸苷不仅可掺入到正常细胞的DNA中，也可掺入到突变细胞的DNA中，表明放射性标记的胸苷进入正常细胞后在胸苷激酶的作用下形成三磷酸胸苷，然后作为DNA合成的前体，通过间隙连接进入突变细胞中参与DNA合成。

代谢偶联作用在协调细胞群体的生物学功能方面，可能起更重要的作用，如当促细胞分泌的激素促胰液素(secretin)作用于胰腺腺泡细胞，其基底面质膜上的受体与激素分子结合，激发细胞内作为第二信使的cAMP和Ca^{2+}浓度增高，促使贮存在分泌泡中的胰蛋白酶向外释放。cAMP和Ca^{2+}都可通过间隙连接从一个细胞进入相邻的细胞中，因此只要有部分细胞接受信号分子的作用后，便可使整个腺泡细胞同时向外分泌消化酶。

(2) 间隙连接在神经冲动信息传递过程中的作用

神经元之间或神经元与效应细胞(如肌细胞)之间通过突触(synapse)完成神经冲动的传导。突触可分为电突触(electronic junction)和化学突触两种基本类型。电突触是指细胞间的某种间隙连接及其形成的低电阻通路，电冲动可直接通过间隙连接从突触前向突触后传导。与化学突触不同，可兴奋细胞间的间隙连接有利于细胞间的快速通讯，动作电位可从一个细胞迅速传到另一个细胞，这对于某些无脊椎动物和鱼类快速准确的逃避反射是十分重要的。如龙虾在外界刺激后的15 ms内即可作出反应。

此外，人们认为间隙连接在神经元之间的通讯及中枢神经系统的整合过程中起重要作用，并以此调节和修饰相互独立的神经元群的行为。间隙连接使细胞间形成电偶联(electrical coupling)，它在协调心肌细胞的收缩，保证心脏正常跳动，协调小肠平滑肌的收缩，控制小肠蠕动等过程中也都起着重要作用。

(3) 间隙连接在早期胚胎发育和细胞分化过程中的作用

间隙连接出现在脊索动物和大多数无脊椎动物胚胎发育的早期。如在小鼠胚胎八细胞阶段，细胞之间普遍建立了电偶联。但是当细胞开始分化后，不同细胞群之间电偶联逐渐消失，说明间隙连接存在于发育与分化的特定阶段的细胞之间。

若用抗连接子蛋白的抗体注射到八细胞蛙胚的某个细胞中，细胞间的电偶联被选择性地阻断，注射的染料只存留在被注射细胞及其子细胞中，并且由于注射了抗体使胚胎发育出现明显的缺陷。一个很吸引人的假说认为，胚胎发育中细胞间的偶联为影响细胞分化的信号物质的传递提供了重要的通路，从而为某一特定细胞提供它的“位置信息”，并根据其位置影响其分化。肿瘤细胞之间间隙连接明显减少或消失，有人认为间隙连接起类似“肿瘤抑制因子”的作用。

一些疾病与连接子蛋白的缺陷有关。通过对相应的连接子蛋白如 C32 和 Cx40 等基因剔除的小鼠的研究进一步证实了这一点。

(4) 间隙连接的通透性是可以调节的

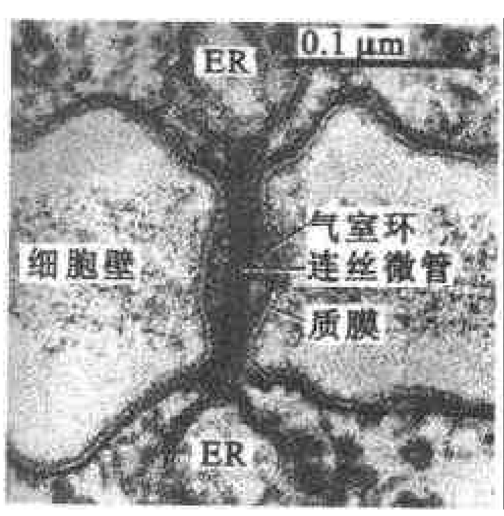
间隙连接的通透速度很快,一般在几秒钟内完成,降低胞质中的 pH 和提高胞质的自由 Ca^{2+} 的浓度都可以使其通透性降低。在某些组织中,间隙连接的通透性还受两侧电压梯度的调控及细胞外化学信号的调控。这些现象表明,间隙连接是一种可以随细胞内的变化而进行开关的动态结构,如同离子通道,不过间隙连接开关的频率远不如离子通道高。

电压和 pH 对间隙连接通透性调节的意义尚不清楚。Ca^{2+} 浓度的升高关闭了间隙连接的通道,至少在阻止细胞外的 Ca^{2+} 进入破损细胞而影响其周围正常细胞代谢活动中起重要作用。

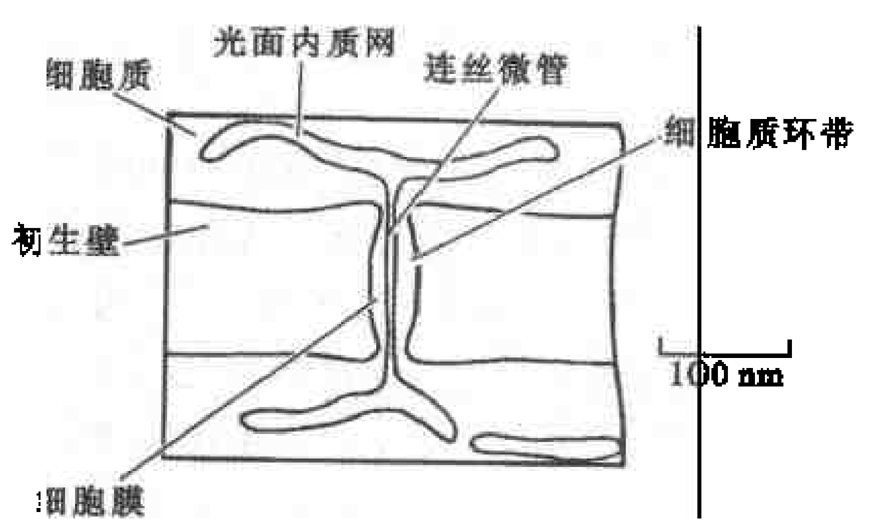
间隙连接通透性受外界化学信号的调节,有助于细胞间的代谢偶联。例如,胰高血糖素能刺激肝细胞分解糖原,然后将葡萄糖释放到血液中,当它作用于肝细胞时,使肝细胞内 cAMP 浓度增加,cAMP 激活了依赖于 cAMP 的蛋白激酶,蛋白激酶又使连接子蛋白磷酸化,导致其构象发生改变,从而使间隙连接通透性增加,这样 cAMP 就可以迅速从一个细胞扩散到周围的肝细胞,最终使肝细胞共同对胰高血糖素的刺激做出反应。

(二) 胞间连丝

除极少数特化的细胞外,高等植物细胞之间通过胞间连丝相互连接,完成细胞间的通讯联络。胞间连丝穿越细胞壁,由相互连接的相邻细胞的细胞膜共同组成的直径为 20～40 nm 的管状结构,中央是由内质网延伸形成的链管结构(图 4－15)。在链管与管状质膜之间是由胞液构成的环带。环带的两端狭窄,可能用以调节细胞间的物质交换。正常情况下,胞间连丝是在细胞分裂时形成的,然而在非姐妹细胞之间也存在胞间连丝,而且在细胞生长过程中胞间连丝的数目还会增加。



A



B

图 4－15 A: 植物细胞之间胞间连丝照片(引自 Karp,1999);
B: 胞间连丝的结构示意图

胞间连丝形成了物质从一个细胞进入到另一个细胞的通路，所以在植物细胞的通讯中起非常重要的作用。例如，在分泌旺盛的细胞中，胞间连丝的数目可达 15 个/μm^2，而一般细胞中约为 1 个/μm^2。同间隙连接一样，可用荧光染料扩散实验和脉冲电流传导实验来研究胞间连丝的功能。向一个细胞中注入荧光染料则染料迅速扩散到相邻的细胞内；同样，向某个细胞加上一定大小的脉冲电流，在相邻细胞中则可检测到脉冲电流的存在，检测到的脉冲电流强度减小的程度与细胞间的胞间连丝数量有关。

胞间连丝介导的细胞间的物质运输也是有选择性的，并且是可以调节的。显微注射荧光染料标记的多肽实验表明，正常情况下，胞间连丝可以允许相对分子质量为 1×10^3、半径约 0.7～0.8 nm 以下的分子自由通过。但是，在有些组织的细胞之间即使是很小的分子也不能通过胞间连丝。其调节机制至今并不十分清楚。很多植物病毒编码一种特殊的运动蛋白(movement proteins)，大多相对分子质量在 30×10^3 左右，可以使胞间连丝的通透性增大而使病毒蛋白和核酸通过胞间连丝感染相邻的细胞。例如烟草花叶病毒可通过其自身的 p30 运动蛋白调节胞间连丝孔径，使病毒粒子从一个细胞进入另一个细胞。p30 蛋白缺陷突变株不能完成对植株的感染。而在有 p30 蛋白少量表达的转基因植株中，突变株病毒又可以恢复感染。

相对分子质量为 90×10^3 的 TMV 运动蛋白与 β 葡糖醛酸酶的融合蛋白也可通过胞间连丝，且实验表明某些细胞蛋白与核酸等生物大分子均可通过胞间连丝进入另一个细胞。因此通过胞间连丝的物质转运机制可能更类似于核孔复合体的物质运输，一种特异的胞间连丝定位信号(plasmodesmal - targeting signal，PTS)，指导特定生物大分子运送至胞间连丝，而胞间连丝复杂的动态结构完成了特定物质的转运。因此植物细胞胞间连丝在协调其基因表达与生理功能中起重要的作用。最近人们用绿色荧光蛋白标记技术发现，在烟草叶肉组织的发育过程中，早期细胞间的胞间连丝可允许相对分子质量为 50×10^3 的蛋白通过，而在成熟细胞中，胞间连丝呈分枝状，只能允许通过相对分子质量为 400 的物质，显示在发育过程中，胞间连丝结构的改变可以调节植物细胞间的物质运输。

(三) 化学突触

化学突触是存在于可兴奋细胞之间的细胞连接方式，它通过释放神经递质来传导神经冲动并因此而得名。在信息传递中，有一个将电信号转化为化学信号，再将化学信号转化为电信号的过程，因此表现出动作电位在传递中的延迟现象。化学突触是相对电突触而言的，它共同完成了可兴奋细胞之间的通讯。关于化学突触的结构和功能请参见生理学教科书。

四、细胞表面的粘着因子

同种类型细胞间的彼此粘连是许多组织结构的基本特征。采用实验手段将胚胎组织分散，然后使其重新聚集，同种组织来源的细胞，如来源于肝、肾或视网

膜的细胞总是毫不例外地聚集粘连在一起。同种组织类型细胞的粘连甚至超越种的差异，如鼠肝细胞倾向于与鸡肝细胞粘连，而不与鼠肾细胞粘连。

目前已经知道，细胞与细胞间的粘连是由特定的细胞粘着因子钙粘素(cadherins)等介导的(表 4－1，图 4－16，图 4－17)，细胞之间的锚定连接也需要粘着因子钙粘素和整联蛋白(integrins)等参与(表 4－2)

粘着因子均为整合膜蛋白，在胞内与细胞骨架成分相连。目前至少可分成五种以上的类型，多数要依赖 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 才起作用。

表 4－1　细胞中主要的粘着因子家族

细胞连接类型	主要成员	Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 依赖性	胞内骨架成分	与细胞连接关系
细胞与细胞连接				
钙粘素	E、N、P 钙粘素	+	肌动蛋白纤维	粘着带
	桥粒－钙粘素	+	中等纤维	桥粒
选择素	P 选择素	+		－
免疫球蛋白类	N 细胞粘着因子	－		－
血细胞整联蛋白	$\alpha_1\beta_2$	+	肌动蛋白纤维	－
细胞与基质连接				
整联蛋白	约 20 种类型	+	肌动蛋白纤维	粘着斑
	$\alpha_6\beta_4$	+	中等纤维	半桥粒
质膜蛋白聚糖	syndecans	－	肌动蛋白纤维	－

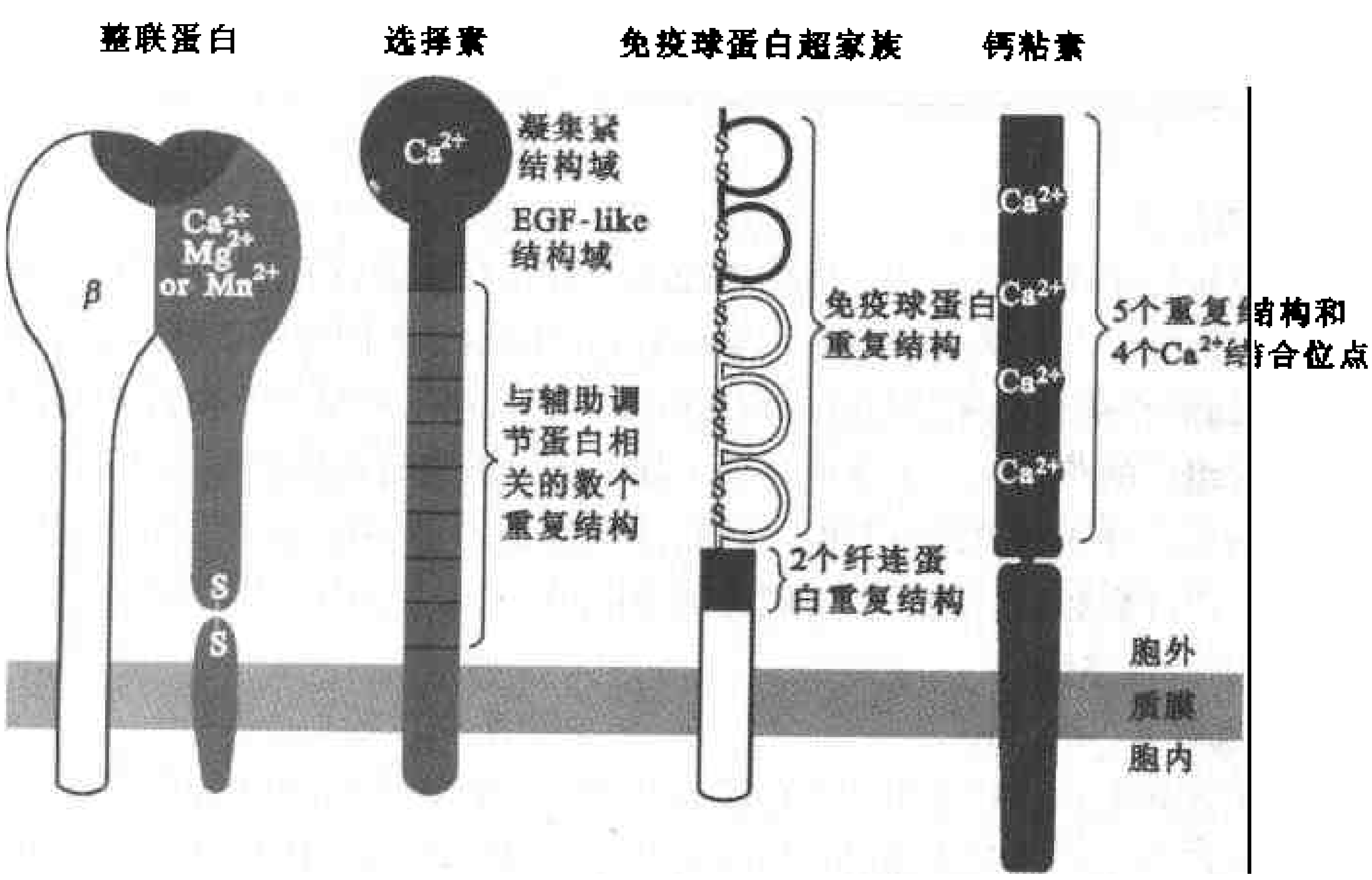


图 4－16　非锚定连接(nonjunctional adhesion)的细胞粘着因子及其作用部位(深色)

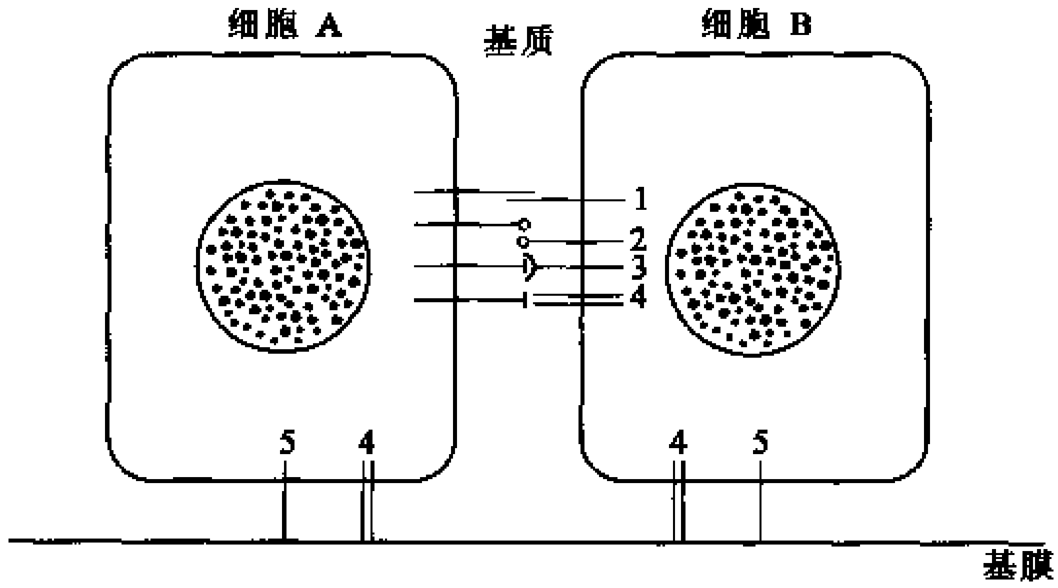


图 4－17　非锚定连接的细胞间粘着方式示意图

1. 钙粘素；2. 免疫球蛋白类细胞粘着因子；3. 选择素；4. 整联蛋白；5. 质膜整合蛋白聚糖

表 4－2　与细胞锚定连接相关的粘着因子

细胞连接类型	粘着因子	胞外	胞内某些结合蛋白	细胞骨架类型
细胞与细胞连接				
桥粒	钙粘素（desmogleins 和 desmocollins）	相邻细胞的钙粘素	desmoplakins plakoglobin	中间纤维
粘着带	钙粘素（E 钙粘素）	同上	vinculin catenin	微丝
细胞与胞外基质连接				
半桥粒	整联蛋白（$\alpha_6\beta_4$）	胞外基质蛋白（基底膜蛋白）	desmoplakin-like 蛋白	中间纤维
粘着斑	整联蛋白	胞外基质蛋白	talin vinculin α－actinin	微丝

1. 钙粘素

一类属同亲性依赖 Ca^{2+} 的细胞粘连糖蛋白，对胚胎发育中的细胞识别、迁移和组织分化以及成体组织器官构成具有主要作用。不同细胞及其发育不同阶段，其表面的钙粘素的种类与数量均有所不同。目前已发现几十种钙粘素，多以所存在的组织的英文第一个字母命名。如上皮组织中的钙粘素称 E 钙粘素。

钙粘素的分子由 720～750 氨基酸残基组成。不同的分子中约有 50％～60％的一级序列相同。其分子的胞外 N 端的 5 个结构域中，有 4 个同源性高且均含 Ca^{2+} 结合部位。

2. 选择素（selectin）

一类属异亲性依赖于 Ca^{2+} 的，能与特异糖基识别并相结合的糖蛋白，其分子的胞外部分具有一凝集素（lectin）结构域。主要参与白细胞与脉管内皮细胞之间的识别与粘着，由于选择素与细胞表面糖脂或糖蛋白的特异糖侧链亲和力较小，加上血流速度的影响，白细胞在脉管中粘着—分离，再粘着—再分离，呈现滚动方式运动，同时活化其他的粘着因子如整联蛋白，最终与之较强地结合在一

起。白细胞就是以这种机制集中到炎症发生的部位。

现已发现至少有三种选择素：P(platelet)选择素、E(endothelial)选择素和L(leukocyte)选择素。它们在脉管与血细胞及细胞之间普遍存在的暂时的粘着功能中起主要的作用。

3. 免疫球蛋白超家族的 CAM(Ig－superfamily)

分子结构中具有与免疫球蛋白类似的结构域的 CAM 超家族。其中有的介导同亲性细胞粘着，有的介导异亲性细胞粘着，但其粘着作用不依赖 Ca^{2+}，其中了解最多的为 NCAMs (nerve-cell adhesion molecules)，它在神经组织细胞间的粘着中起主要作用。不同的 NCAMs 由单一基因编码，但由于其 mRNA 剪接不同和糖基化各异而产生 20 余种不同的 NCAMs。

NCAM 在胚胎发育早期神经与神经管形成时开始表达。在已分化的神经元、神经胶质细胞及肌细胞表面稳定表达。NCAM 与配体的亲和力可能通过其分子糖侧链中唾液酸残基的数目来调节。胚胎时表达的 NCAM 中唾液酸占整个分子质量的 25%，而成体中唾液酸化为胚胎时期 NCAM 中的 1/3，显然这使成体神经细胞之间建立更稳定的结合。

4. 整联蛋白

一类重要的细胞粘着因子，是由 α 和 β 两个亚基形成的异源二聚体糖蛋白。人体细胞中已发现 16 种 α 链和 8 种 β 链，它们相互配合形成 22 种不同的二聚体整联蛋白，可与不同的配体结合，从而介导细胞与基质、细胞与细胞之间的粘着。整联蛋白识别的主要部位是配体上的 RGD 三肽结构。此外，整联蛋白在细胞内外信号转导中起着十分重要的作用，这方面内容将在第六章介绍。

此外，质膜上的蛋白聚糖类整合膜蛋白也介导细胞间的粘着。目前，通过 X 射线衍射晶体分析，一些主要的细胞粘着因子的三维结构已比较清楚，这对于深入了解粘着因子与配体的识别及其相互作用机制提供了重要的信息。

第三节　细胞外被与细胞外基质

细胞外被(cell coat)又称糖萼(glycocalyx)，曾用来指细胞膜外表面覆盖的一层粘多糖物质(图 4－18)，实际上，细胞外被中的糖与细胞膜中的蛋白分子或脂质分子是共价结合的，形成糖蛋白和糖脂，所以，细胞外被应是细胞膜的正常结构组分，它不仅对膜蛋白起保护作用，而且在细胞识别中起重要作用。

细胞外基质(extracellular matrix)是指分布于细胞外空间，由细胞分泌的蛋白和多糖所构成的网络结构(图 4－19)。

组织的构建是多细胞相互作用的结果，动物组织中的细胞不仅与相邻细胞接触和作用，同时亦与由分泌蛋白和多糖组成的充满胞外空间的复杂网络结构，即细胞外基质相接触和作用。细胞外基质将细胞粘连在一起构成组织，同时，提供一个细胞外网架，在组织中或组织之间起支持作用，如胶原赋予组织抗张能力，弹性蛋白及蛋白多糖为组织的弹性和耐压性所必需。

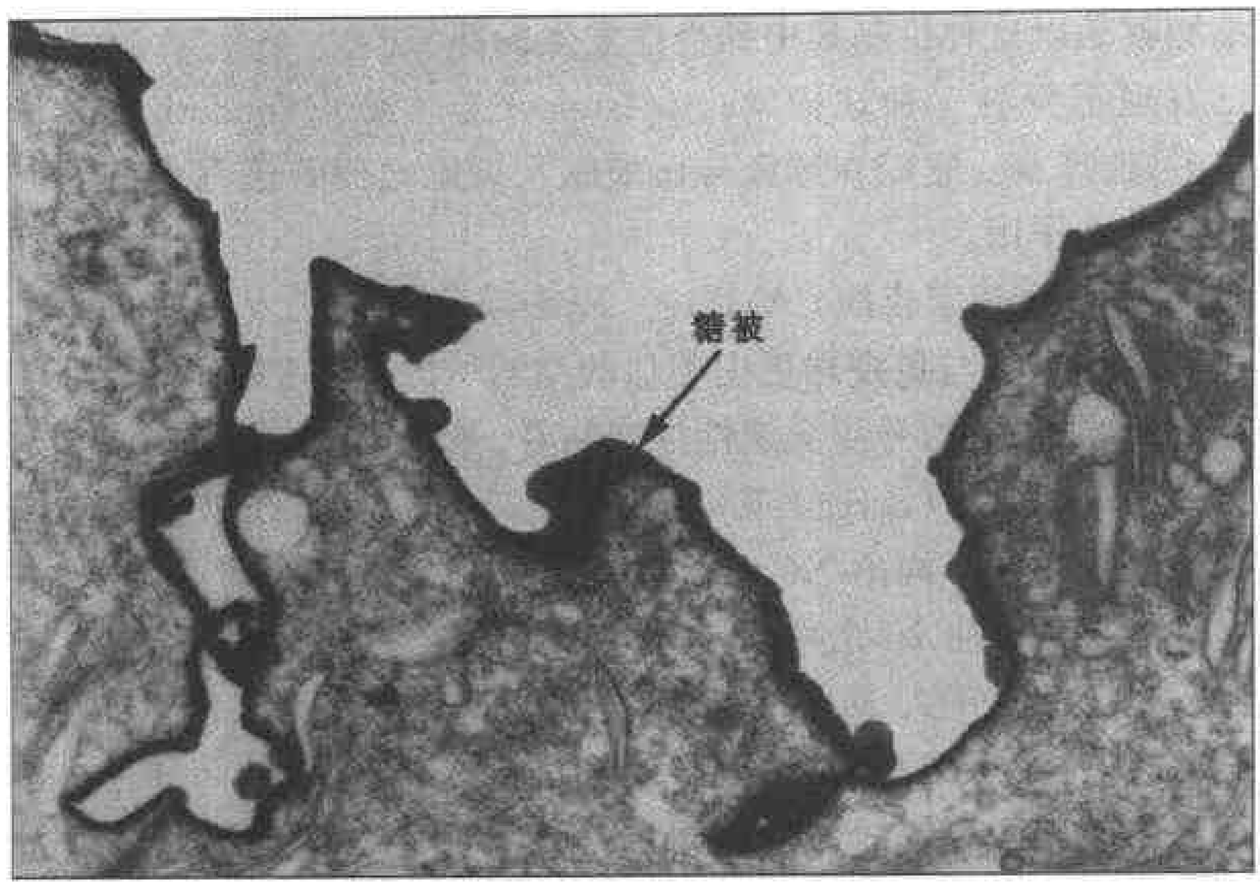


图 4－18　膀胱上皮细胞表面的糖被，钌红染色的电镜超薄切片(梁凤霞，厂明孝)

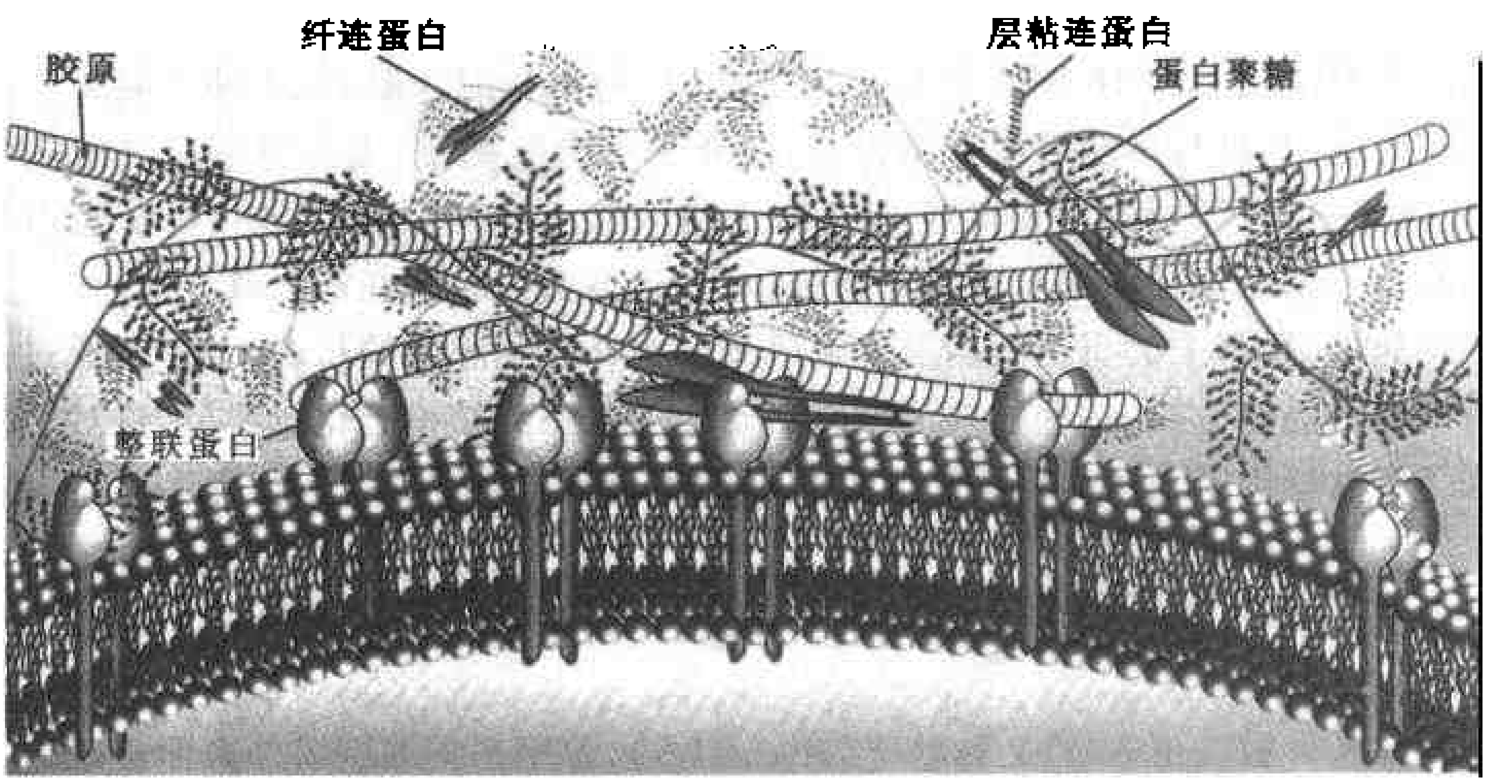


图 4－19　细胞外基质主要成分与结构示意图(引自 Karp,1999)

胞外基质不仅是支持细胞的框架，其三维结构及成分的变化，如基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease)等的水解作用，往往改变细胞微环境从而对细胞形态、生长、分裂、分化和凋亡起重要的调控作用。很多编码胞外基质成分或其受体基因的突变可导致多种疾病甚至肿瘤的发生，因此对胞外基质的信号功能及其与疾病之间关系的研究越来越成为人们关注的焦点。

一、胶原

1. 类型

胶原(collagen)是胞外基质最基本成分之一,也是动物体内含量最丰富的蛋白,约占人体蛋白质总量的30%以上。目前已发现的胶原类型多达20种,几种常见的胶原类型及其在组织中的分布列于表4-3。

表4-3　几种类型的胶原及分布

类型	亚单位	三股螺旋长度	超分子结构特征	分布
Ⅰ	$[\alpha_1(\text{I})]_2[\alpha_2(\text{I})]$	300 nm	67 nm 横纹纤维	皮肤、肌腱、骨、韧带等
Ⅱ	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	300 nm	67 nm 横纹纤维	软骨、髓核、玻璃体等
Ⅲ	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	300 nm	67 nm 横纹纤维	皮肤、肌肉、结缔组织, 常与Ⅰ型胶原共分布
Ⅳ	$[\alpha_1(\text{IV})]_2[\alpha_2(\text{IV})]$	390 nm	网状 C端球状 不形成纤维束	基膜
Ⅴ	$[\alpha_1(\text{V})]_2[\alpha_2(\text{V})]$ $[\alpha_3(\text{V})]_3$	390 nm	细纤维 N端球状	大多间隙组织 与Ⅰ型胶原共分布
Ⅵ	$[\alpha_1(\text{VI})][\alpha_2(\text{VI})][\alpha_3(\text{VI})]$	150 nm	微纤维 N和C端球状 100 nm 横纹	大多间隙组织 与Ⅰ型胶原共分布

亚单位一栏中罗马数字代表胶原类型,α_1、α_2、α_3分别代表肽链类型,中括号外的数字代表肽链数目。

胶原是细胞外基质中最主要的水不溶性纤维蛋白。目前了解最多的是Ⅰ~Ⅳ型胶原。Ⅰ~Ⅲ型胶原含量最丰富,形成类似的纤维结构。Ⅰ型胶原常形成较粗的纤维束,分布广泛,主要存在于皮肤、肌腱、韧带及骨中,具有很强的抗张强度;Ⅱ型胶原主要存在于软骨中;Ⅲ型胶原形成微细的原纤维网,广泛分布于伸展性的组织,如疏松结缔组织;Ⅳ型胶原形成二维网格样结构,是基膜的主要成分及支架。

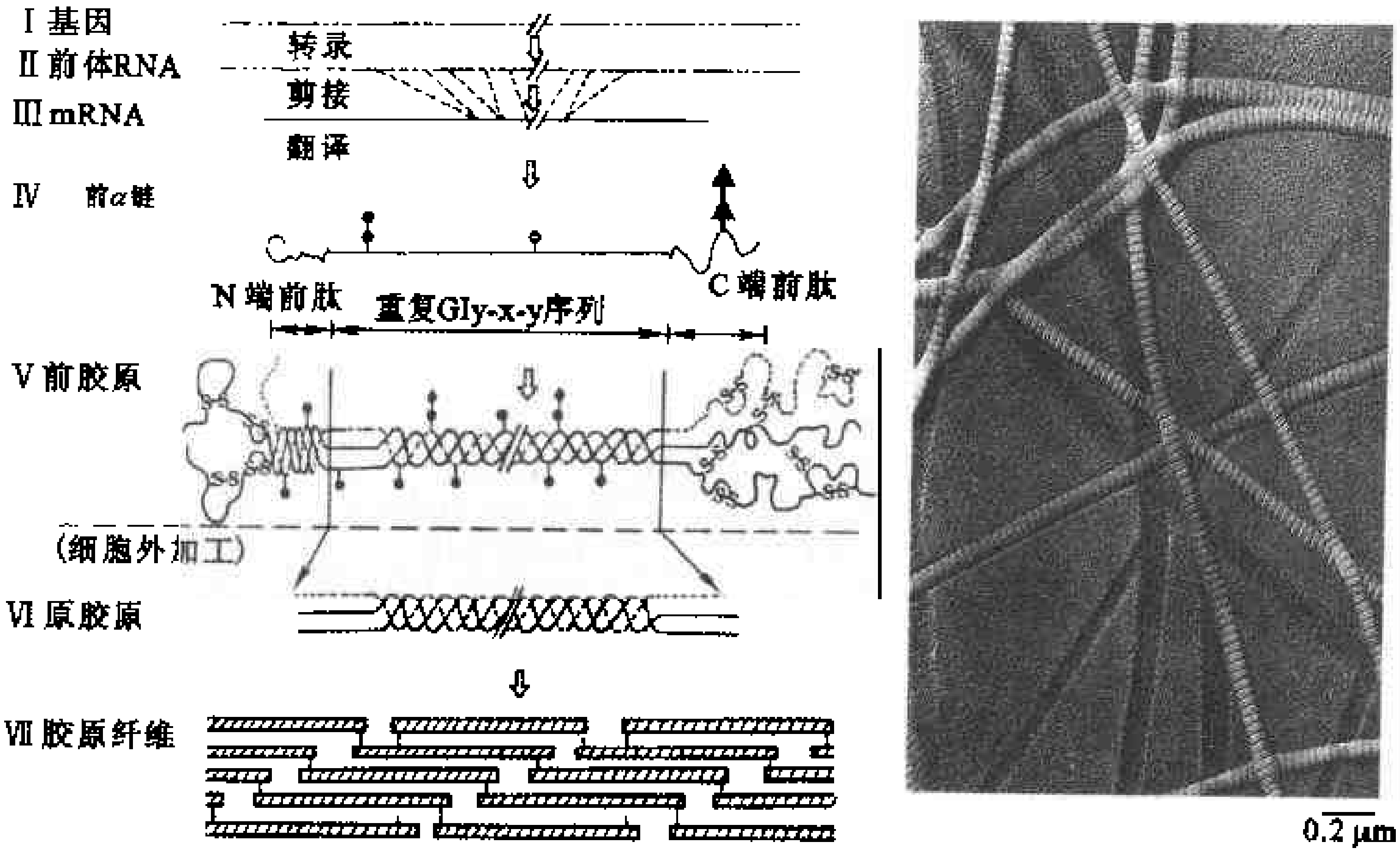
2. 分子结构

胶原纤维的基本结构单位是原胶原。原胶原是由三条多肽链盘绕成的三股螺旋结构,长300 nm,直径1.5 nm(图4-20)。原胶原肽链的氨基酸组成及排列独特,甘氨酸含量占1/3,脯氨酸及羟脯氨酸约占1/4。

原胶原肽链的一级结构具有Gly-x-y重复序列,Gly:甘氨酸,x:常为脯氨酸(Pro),y:常为羟脯氨酸(Hypro)或羟赖氨酸(Hylys)。

胶原蛋白的特殊氨基酸序列反映了其基因组成,如编码α_1(Ⅰ)肽链的基因含41个外显子,多数外显子含54bp,编码含6个重复的Gly-x-y序列的原始单位(primordial unit),其他外显子编码2个或3个这样的原始单位。已发现20多个编码不同胶原肽链的基因,它们具有相似的结构组成。

胶原肽链Gly-x-y的序列对胶原纤维的高级结构的形成是重要的。胶原对于氨基酸残基突变,尤其是Lys残基的突变是高度敏感的,导致三股螺旋形成



A　　B

图 4－20　A:胶原纤维的分子结构与形成过程;B:(Ⅰ～Ⅶ)及胶原纤维的电镜照片

障碍。

在胶原纤维内部,原胶原蛋白分子呈 1/4 交替平行排列,一个原胶原分子的头部与下一个原胶原分子的尾部有一个小的间隙分隔,这种排列在胶原纤维上形成长度为 67 nm 的周期性横纹(图 4－20B)。平行排列的分子通过原胶原分子 N 端与相邻原胶原分子 C 端的赖氨酸或羟赖氨酸间形成共价键加以稳定。

3. 合成

前胶原(procollagen)是原胶原的前体和分泌形式。前胶原在三股螺旋两端具有 150 个氨基酸残基的 N 端前肽(propeptide)和 250 个氨基酸残基的 C 端前肽,前肽的一级结构没有 Gly－x－y 序列,具有较多酸性氨基酸及芳香族氨基酸残基,并含有半胱氨酸残基,在 N 端前肽形成链内二硫键,在 C 端前肽形成链内及链间二硫键。在Ⅰ型胶原的三股螺旋间没有二硫键,前胶原 C 端的 5 个链间二硫键在糙面内质网中形成,然后三条多肽链由 C→N 方向盘绕形成三股螺旋,链间二硫键在三股螺旋形成前对稳定前胶原三条多肽链的联系起重要作用。

胶原肽链的翻译在糙面内质网进行,合成带有信号肽的早前胶原(preprocollagen)。胶原纤维的装配始于内质网,在高尔基体中继续进行,完成于细胞外。在糙面内质网中形成三股螺旋之前,除切除信号肽外,还进行一些重要的化学修饰反应,如 Gly－x－y 序列中某些 Pro 和 Lys 残基的羟化,抗坏血酸是重要的辅助因子。未羟化的前胶原肽链在细胞内降解,因此缺乏抗坏血酸则胶原生成不良。羟化的赖氨酸可进一步发生糖基化,经过修饰的前 α 链自发聚合形成三股螺旋的前胶原,然后通过高尔基体分泌到细胞外,在两种专一性不同的蛋白水解酶作用下,分别切去 N 端前肽及 C 端前肽,成为原胶原。两端各保留一段

非螺旋区域，称为端肽区(telopeptide region)。原胶原进而聚合成胶原纤维。Ⅰ型胶原纤维由长度为 300 nm 的原胶原三股螺旋交替排列而成，直径为 50 nm，长度可达数毫米。伴随着胶原纤维的装配，某些赖氨酸和羟赖氨酸残基被细胞外的赖氨酸氧化酶氧化为醛，在多肽链间自然形成共价交联，对胶原纤维的稳定和强度起重要作用。准确地切除 N 端和 C 端前肽对胶原纤维的正常装配是必需的。在 Ehlers-Danlos 综合症中，由于缺乏一种切除前肽的酶，则胶原不能正常装配为高度有序的纤维。目前已发现多种由于胶原纤维的缺陷而引起的疾病。

4. 功能

胶原在细胞外基质中含量最高，刚性及抗张力强度最大，构成细胞外基质的骨架结构，细胞外基质中的其他组分通过与胶原结合形成结构与功能的复合体。

同一组织中常含有几种不同类型的胶原，但常以某一种为主。在不同组织中，胶原装配成不同的纤维形式，以适应特定功能的需要，最显著的是在骨和角膜中，胶原纤维分层排布，同一层的胶原彼此平行，而相邻两层的纤维彼此垂直，形成三合板样的结构，使组织具有牢固、不易变形的特性。

胶原纤维具有很高的抗张力强度，特别是Ⅰ型胶原。胶原纤维束构成肌腱，连接肌肉和骨骼。单位横截面的Ⅰ型胶原抗张力比铁还强。

胶原可被胶原酶特异降解，而参入到胞外基质信号传递的调控网络中。

二、糖胺聚糖和蛋白聚糖

1. 糖胺聚糖

糖胺聚糖(glycosaminoglycan)是由重复的二糖单位构成的长链多糖，其二糖单位之一是氨基己糖(氨基葡萄糖或氨基半乳糖)，故称为糖胺聚糖；另一个是糖醛酸(图 4－21)。糖胺聚糖可分为透明质酸、4－硫酸软骨素、6－硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、肝素和硫酸角质素等。

透明质酸(hyaluronic acid)是一种重要的糖胺聚糖，是增殖细胞和迁移细胞胞外基质的主要成分，尤其在胚胎组织中。同时也是蛋白聚糖的主要结构组分。透明质酸在结缔组织中起强化、弹性和润滑作用。一个透明质酸分子通常由多达 5 000 个二糖单位[葡萄糖醛酸 $\beta(1\rightarrow3)N$－乙酰氨基葡萄糖]重复排列构成，由于二糖间的 β 连接和众多的链内氢键，透明质酸形成一个长且具有刚性的主干。由于其分子表面含有大量亲水基团，透明质酸结合大量水分子形成粘性的水化凝胶，如果没有空间制约的因素，透明质酸分子可以占据比其自身体积大 1 000～10 000 倍的空间。同时，透明质酸分子表面的—COO^- 基团结合阳离子，增加了离子浓度和渗透压，大量水分子被摄入基质。因此在胞外基质中，透明质酸倾向于向外膨胀，产生压力，使结缔组织具有抗压的能力，而胶原纤维使组织具抗张的能力。

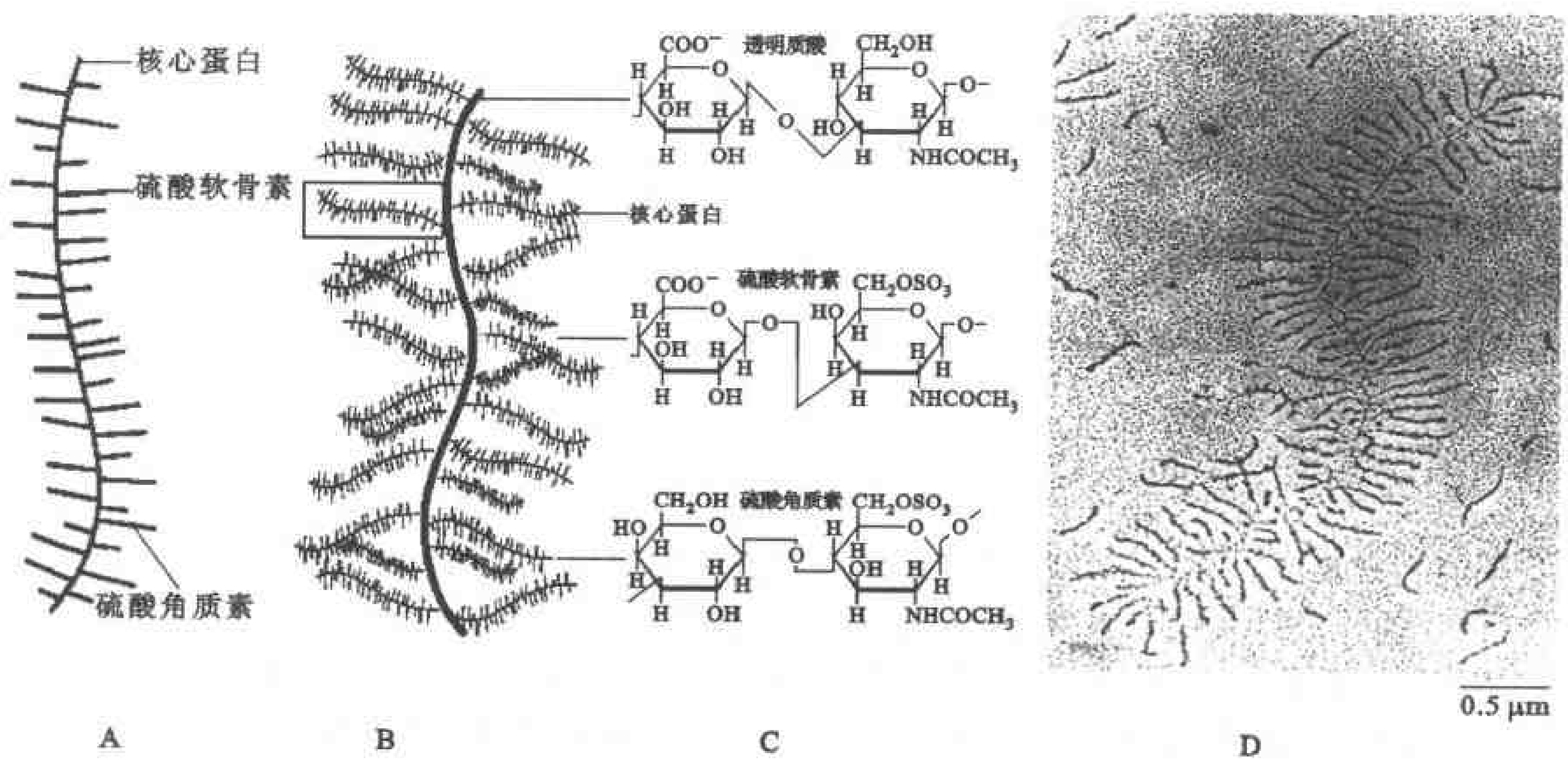


图 4-21　蛋白聚糖构成的模式图(A,B)、某些糖胺聚糖的分子式(C)和软骨中的蛋白聚糖电镜照片(D)

透明质酸结合于许多迁移细胞的表面。因其自身的特性，透明质酸使细胞保持彼此分离，使细胞易于运动迁移和增殖并阻止细胞分化。一旦细胞迁移停止或增殖够数，便由透明质酸酶将之破坏。在发育过程中，透明质酸的作用似乎是防止细胞在增殖够数或迁移到位之前过早地进行分化。胚胎发生中，生骨节(sclerotome)细胞的迁移和分化及肌节(myotome)的分化是两个典型的例子，透明质酸均发生上述变化。

2. 蛋白聚糖

蛋白聚糖(proteoglycan)见于所有结缔组织和细胞外基质及许多细胞表面，由糖胺聚糖与核心蛋白(core protein)的丝氨酸残基共价连接形成的巨分子，其含糖量可达 90%～95%。一个核心蛋白上可连接数百个不同的糖胺聚糖形成蛋白聚糖单体，若干个单体借连接蛋白(linker protein)以非共价键与透明质酸结合形成多聚体。蛋白聚糖的一个显著特点是多态性，可以含有不同的核心蛋白，长度和成分不同的多糖链。蛋白聚糖根据其主要的二糖单位命名。

软骨中的蛋白聚糖是已知的最大巨分子之一，单个分子长达 4 μm，体积比细菌大，这些蛋白聚糖赋予软骨以凝胶样特性和抗变形能力。软骨蛋白聚糖中心组分是透明质酸，许多硫酸软骨素蛋白聚糖的核心蛋白通过非共价键紧密结合于透明质酸上，这种结合被连接蛋白所稳定。每个核心蛋白上附着有多条硫酸软骨素和硫酸角质素糖胺聚糖链。蛋白聚糖单体(核心蛋白及其结合的糖胺聚糖)的相对分子质量平均为 2×10^6，整个蛋白聚糖多聚体的相对分子质量高达 2×10^8(图 4-21)。

并非所有蛋白聚糖都形成巨大的聚合物，如基膜中的蛋白聚糖，由一个相对分子质量 20×10^3～400×10^3 的核心蛋白和附着的几个硫酸肝素链构成。这种

蛋白聚糖结合于Ⅳ型胶原，构成基膜的结构组分。

蛋白聚糖可与成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子 β(TGFβ)等多种生长因子结合，因而可视为细胞外的激素富集与储存库，有利于激素分子进一步与细胞表面受体结合，有效完成信号的传导。

三、层粘连蛋白和纤连蛋白

胞外基质存在多种非胶原糖蛋白，其结构与功能了解最多的是层粘连蛋白与纤连蛋白。

1. 层粘连蛋白

层粘连蛋白(laminin)是各种动物胚胎及成体组织的基膜的主要结构组分之一。层粘连蛋白是高分子糖蛋白(相对分子质量 820×10^3)，由一条重链(A 链，相对分子质量 400×10^3)和 B_1(相对分子质量 215×10^3)及 B_2(相对分子质量 205×10^3)两条轻链(分别称 α、β 和 γ 链)构成。已发现 8 种亚单位(α_1、α_2、α_3、β_1、β_2、β_3、γ_1、γ_2)至少构成 7 种不同的层粘连蛋白。旋转投影及负染电镜图显示，层粘连蛋白呈不对称十字形，由一条长臂及 3 条相似的短臂构成(图 4－22)。

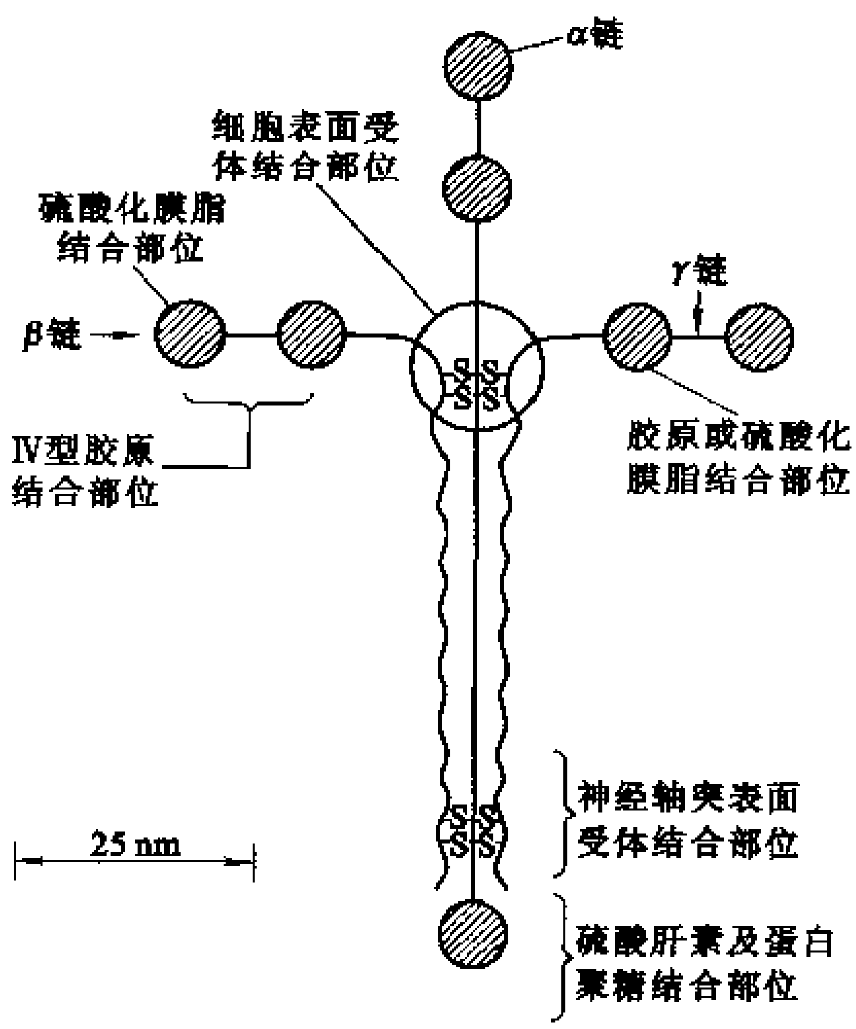


图 4－22 层粘连蛋白分子示意图

通常细胞不直接与Ⅳ型胶原或蛋白聚糖结合，而是通过层粘连蛋白将细胞锚定于基膜上。层粘连蛋白中至少存在两个不同的受体结合部位：一是与Ⅳ型胶原的结合部位；另一个是通过自身的 Arg－Gly－Asp(R－G－D)序列与细胞

膜上的整联蛋白结合。

层粘连蛋白作为基膜的主要结构成分，与另一种称为 nidogen 的蛋白（相对分子质量 158×10^3，可与 laminin、Ⅳ型胶原和蛋白聚糖结合）相互作用。

层粘连蛋白在胚胎发育及组织分化中具有重要作用。个体发生中出现最早的细胞外基质蛋白是层粘连蛋白，卵母细胞及受精卵均表达 B_1 链，4～8 细胞期表达 B_1 及 B_2 链，至桑椹胚期则 A，B_1，B_2 三种亚单位全部表达，同时在细胞间出现层粘连蛋白。层粘连蛋白出现于早期胚中对于保持细胞间粘连、细胞的极性及细胞的分化都有重要意义。层粘连蛋白也与肿瘤细胞的转移有关。

2. 纤连蛋白

纤连蛋白（fibronectin）是高分子量糖蛋白，含糖 4.5%～9.5%，其亚单位相对分子质量为 220×10^3～250×10^3。各亚单位在 C 端形成二硫键交联。血浆纤连蛋白是二聚体，由两条相似的 A 链及 B 链组成，整个分子呈 V 形。细胞纤连蛋白是多聚体。目前至少已鉴定了20种纤连蛋白多肽。纤连蛋白不同的亚

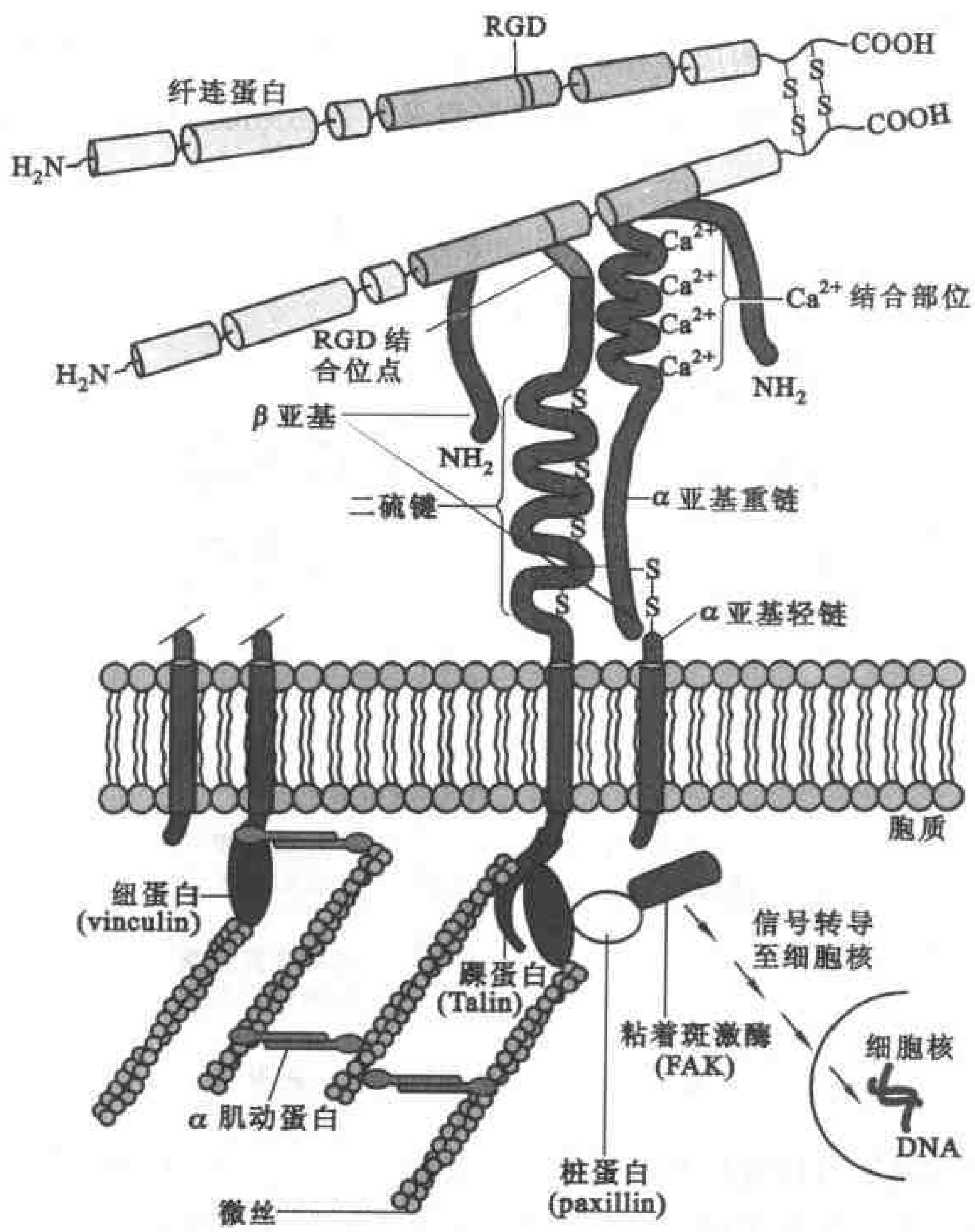


图 4－23　纤连蛋白分子及其通过整联蛋白与细胞内骨架系统结合的示意图

单位为同一基因的表达产物，只是在转录后 RNA 的剪接上有所差异，因而产生不同的 mRNA。纤连蛋白的每个亚单位由数个结构域构成，具有与细胞表面受体、胶原、fibrin 和硫酸蛋白多糖高亲和性的结合部位，用蛋白酶进一步消化与细胞膜蛋白结合区，发现这一结构域中 RGD 三肽序列是细胞识别的最小结构单位（图 4－23）。

纤连蛋白的膜蛋白受体即为整联蛋白家族成员之一，在其细胞外功能区有与 RGD 高亲和性结合部位。

纤连蛋白的主要功能是介导细胞粘着。纯化的纤连蛋白可增强细胞间粘连及细胞与基质的粘连。通过粘着，纤连蛋白可以通过细胞信号转导途径调节细胞的形状和细胞骨架的组织，促进细胞铺展。在胚胎发生过程中，纤连蛋白对于许多类型细胞的迁移和分化是必需的。在创伤修复中，纤连蛋白亦是重要的，如促进巨噬细胞和其他免疫细胞迁移到受损部位，在血凝块形成过程中，纤连蛋白促进血小板附着于血管受损部位。

纤连蛋白促进细胞迁移，一个突出的例子是胚胎发生早期神经脊细胞的迁移。在神经管形成时，神经脊细胞从神经管的背侧迁移到胚胎各个区域，分化成神经节、色素细胞等不同类型的细胞。显微注射纤连蛋白受体的抗体或含 RGD 序列的短肽可以阻断细胞的迁移。

四、弹性蛋白

弹性蛋白（elastin）是弹性纤维的主要成分。弹性纤维主要存在于脉管壁及肺，亦少量存在于皮肤、肌腱及疏松结缔组织中。弹性纤维与胶原纤维共同存在，分别赋予组织以弹性及抗张性。

弹性蛋白是高度疏水的非糖基化蛋白，约含 830 个氨基酸残基。它的氨基酸组成像胶原一样富含甘氨酸和脯氨酸，很少含羟脯氨酸，不含羟赖氨酸，没有 Gly－x－y 序列。弹性蛋白具有两个明显的特征：① 构象呈无规则卷曲状态；② 通过 Lys 残基相互交联成网状结构。

五、植物细胞壁

植物细胞壁由纤维素、半纤维素、果胶质等几种大分子构成，其功能为细胞提供一个细胞外网架，对细胞起支持作用等。纤维素是由葡萄糖分子以 $\beta(1\rightarrow4)$糖苷键连接起来的线性多聚体分子。纤维素分子聚集成束，形成长的微原纤维（microfibril），微原纤维的走向受细胞质中微管网架的影响。纤维素分子为细胞壁提供了抗张强度。

半纤维素是由木糖、半乳糖和葡萄糖等组成的高度分支的多糖，通过氢键与纤维素微原纤维连接。半纤维素的分支有助于将微原纤维彼此连接或介导微原纤维与其他基质成分（例如果胶质）连接。

果胶质像透明质酸一样，含有大量携带负电荷的糖，如半乳糖醛酸等。果胶质结合诸如 Ca^{2+} 等阳离子，被高度水化，可形成凝胶，常用于食品加工。果胶质与半纤维素横向连接，参与细胞壁复杂网架的形成。

伸展蛋白(extensin)是由大约 300 个氨基酸残基组成的糖蛋白，在初生细胞壁中含量可多达 15%。伸展蛋白含有大量羟脯氨酸残基，其肽链长度的一半是 Ser－Hyp－Hyp－Hyp 四肽序列的重复。大多羟脯氨酸为含 3～4 个阿拉伯糖残基的寡糖链所糖基化，丝氨酸连接有半乳糖，糖的总量约占 65%。

木质素(lignin)是由酚残基形成的水不溶性多聚体。次生壁形成时，木质素开始合成，并以共价键与细胞壁多糖交联，大大增加了细胞壁的强度与抗降解力。

初生细胞壁可看成为凝胶样基质，纤维素纤维埋于其中。这种细胞壁比动物细胞的胞外基质具有更大的通透性，水和离子可以在细胞壁中自由扩散。植物激素相对分子质量一般为 500 以下的水溶性小分子，也可自由扩散。而直径大于 4 nm 的颗粒，包括相对分子质量 20×10^3 以上的蛋白质，扩散能力明显下降。

细胞壁中某些寡糖成分可作为信号物质，当外界病原体入侵时，真菌或植物细胞壁中的多糖水解产生特定寡糖成分，它们可诱导编码植物抗毒素合成酶的基因表达，产生植物抗毒素(phytoalexins)杀死病原体。有证据显示，细胞壁多糖中的某些寡糖片段可以作为细胞生长和发育的信号物质。在植物细胞壁中，也发现类似动物细胞的蛋白聚糖，如阿拉伯半乳聚糖蛋白(Arabinogalactan-proteins)，其广泛分布且含量丰富。它在植物组织发育、细胞增殖及胚胎发生中与所涉及的细胞间信号传导和细胞与胞外基质的相互作用有关。

提　　要

细胞膜与其他生物膜一样都是由膜脂与膜蛋白构成的。膜蛋白可分为膜内在蛋白与膜周边蛋白。脂双分子层构成了膜的基本结构。各种不同的膜蛋白与膜脂分子的协同作用不仅为细胞的生命活动提供了稳定的内环境，而且还行使着物质转运、信号传递、细胞识别等多种复杂的功能。流动性和不对称性是生物膜的基本特征，也是完成其生理功能的必要保证。

细胞表面特化结构主要包括膜骨架、鞭毛、纤毛、变形足和微绒毛，它们都是细胞膜与膜内的细胞骨架纤维形成的复合结构，分别与维持细胞的形态、细胞的运动、细胞与环境的物质交换等功能有关。

在多细胞机体中，细胞之间的连接主要有 3 种类型：以紧密连接为代表的封闭连接可阻止溶液中的分子沿细胞间隙进入体内，同时还起到膜蛋白的隔离作用；锚定连接是通过中间纤维(桥粒、半桥粒)或微丝(粘着带和粘着斑)将相邻的细胞或细胞与基质连接在一起，以形成坚挺有序的细胞群体、组织与器官；通讯连接(包括间隙连接和化学突触)则在细胞之间的代谢偶联、信号转导等过程中

起重要作用。高等植物细胞之间通过胞间连丝来进行物质交换与相互联系。

细胞外被是指与细胞表面质膜的膜脂或膜蛋白共价结合的糖链形成的包被，起保护细胞和细胞识别的作用。胞外基质的基本成分是由胶原蛋白与弹性蛋白组成的蛋白纤维和由糖胺聚糖与蛋白聚糖形成的水合胶体构成的复杂的结构体系，层粘连蛋白和纤连蛋白具有多个结合位点，在细胞与胞外基质成分相互粘着中起重要作用。胞外基质不仅提供细胞外的网架赋予组织以抗压和抗张力的机械性能，而且还与细胞的增殖分化和凋亡等重要生命活动有关。

细胞壁可看作是高等植物细胞的胞外基质，主要成分是纤维素、半纤维素、果胶质、伸展蛋白和蛋白聚糖等。细胞壁不仅起支持与保护作用，而且其中的某些寡糖具有信号分子的作用。

思 考 题

1．生物膜的基本结构特征是什么？这些特征与它的生理功能有什么联系？
2．何谓膜内在蛋白？膜内在蛋白以什么方式与膜脂相结合？
3．从生物膜结构模型的演化谈谈人们对生物膜结构的认识过程。
4．细胞表面有哪几种常见的特化结构？膜骨架的基本结构与功能是什么？
5．细胞连接有哪几种类型，各有何功能？
6 胞外基质的组成、分子结构及生物学功能是什么？

参 考 文 献

1. Lodish, *et al*. Moleculer Cell Biology. New York and Oxford: Scientific American Books, Inc., 1995

2. Albert, *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publshing Inc., 1998

3. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编．细胞生物学.第二版．北京：北京师范大学出版社，1998

4. Ken Jacobson, Chrisian Dietrich. Looking at lipid Rafts? Trends in Cell Biology, 1999, (9):87～91

5. Alexander M Simon, *et al*. Diverse Functions of Vertebrate Gap Junction. Trends in Cell Biology, 1998, (8):477～483

第五章

物质的跨膜运输与信号传递

第一节　物质的跨膜运输

细胞膜是细胞与细胞外环境之间的一种选择性通透屏障，它既能保障细胞对基本营养物质的摄取、代谢废物的排除和细胞内离子浓度的调节，又能使细胞维持相对稳定的内环境。因此，物质的跨膜运输对细胞的生存和生长至关重要。物质通过细胞膜的转运主要有三种途径：被动运输、主动运输和胞吞与胞吐作用。

一、被动运输

被动运输（passive transport）是指通过简单扩散或协助扩散实现物质由高浓度向低浓度方向的跨膜转运。转运的动力来自物质的浓度梯度，不需要细胞提供代谢能量。

（一）简单扩散

小分子的热运动可使分子以简单扩散的方式从膜的一侧通过细胞膜进入膜的另一侧，其结果是分子沿着浓度梯度降低的方向转运。疏水的小分子或小的不带电荷的极性分子在以简单扩散的方式跨膜转运中，不需要细胞提供能量，也没有膜蛋白的协助，因此称为简单扩散（simple diffusion）。不同的小分子物质跨膜转运的速率差异极大，也就是说，不同分子的通透系数有很大区别，如 O_2、N_2 和苯等极易通过细胞膜，水分子也比较容易通过，尿素的通透性比水分子低 100 倍。然而即使这种低速的转运在细胞生命活动中也具有一定的生理功能。图 5－1 显示在通过无蛋白的人工脂双层时，不同分子具有不同的跨膜运动速率。

一般认为，在简单扩散的跨膜转运中，涉及跨膜物质溶解在膜脂中，再从膜脂一侧扩散到另一侧，最后进入细胞质水相中。因此，其通透性主要取决于分子大小和分子的极性。小分子比大分子容易穿膜，非极性分子比极性分子容易穿膜，而带电荷的离子跨膜运动则需要更高的自由能，所以无蛋白的人工脂双层对带电荷的离子是高度不透的。具有极性的水分子容易穿膜可能是因水分子非常

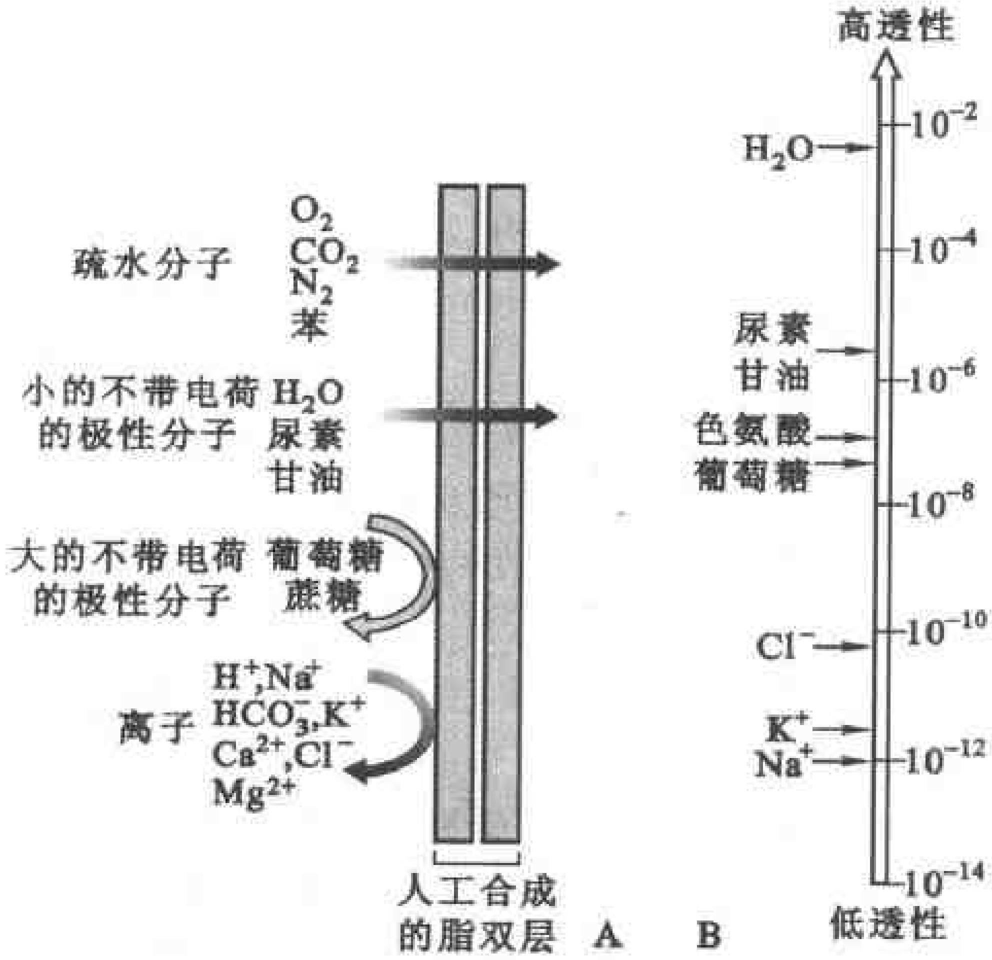


图 5－1　A：人工脂双层膜对不同分子的相对透性；
B：不同分子通过人工脂双层膜的渗透系数
（引自 B. Alberts 等）

小，可以通过由于膜脂运动而产生的间隙。

某种物质对膜的通透性(P)可以根据它在油和水中的分配系数(K)及其扩散系数(D)来计算：$P = KD/t$（t 为膜的厚度）。

（二）协助扩散

协助扩散(facilitated diffusion)是各种极性分子和无机离子，如糖、氨基酸、核苷酸以及细胞代谢物等顺其浓度梯度或电化学梯度减小方向的跨膜转运，该过程不需要细胞提供能量，这与简单扩散相同，因此两者都称为被动运输。但在协助扩散中，特异的膜蛋白“协助”物质转运使其转运速率增加，转运特异性增强。

例如葡萄糖分子以简单扩散的方式穿越细胞膜，其通透系数为 10^{-7}cm/s，以协助扩散的方式穿越红细胞的质膜时其通透系数为 10^{-2}cm/s，通透系数增加了 10^5 倍。如果以通透性(或转运速率)为纵坐标，以葡萄糖浓度为横坐标，将两种跨膜转运方式的曲线进行比较(图 5－2)就会发现，协助扩散具有以下的特征：

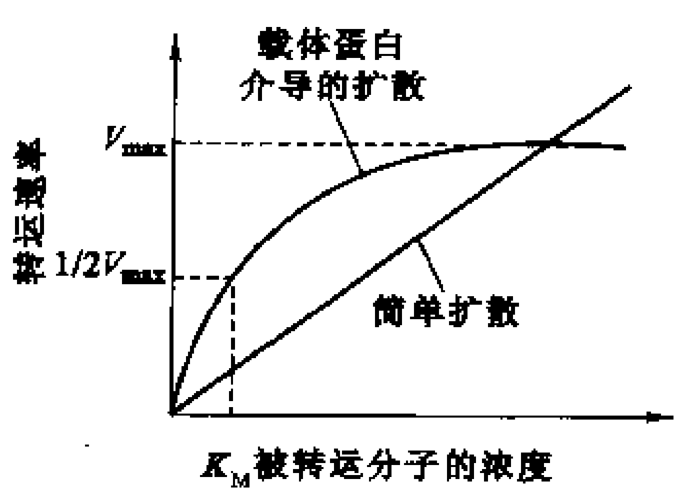


图 5－2　简单扩散与协助扩散的比较

(1) 转运速率高。

(2) 存在最大转运速率(V_{max})，因

此，可用达到最大转运速率一半时的葡萄糖浓度作为其 K_M 值，用以衡量某种物质的转运速率。

(3) 比较不同分子的 K_M 值，可以看出转运的特异性，如红细胞质膜，D 构型的葡萄糖 K_M 为 1.5 mmol/L，而 L 构型的葡萄糖 K_M 值＞3 000 mmol/L。

(4) 细胞膜上存在膜转运蛋白(membrane transport proteins)，负责无机离子和水溶性有机小分子的跨膜转运。

膜转运蛋白可分为两类：一类称载体蛋白(carrier proteins)，它既可介导被动运输，又可介导逆浓度或电化学梯度的主动运输；另一类称通道蛋白(channel proteins)，只能介导顺浓度或电化学梯度的被动运输。

1. 载体蛋白及其功能

载体蛋白是几乎所有类型的生物膜上普遍存在的多次跨膜蛋白分子。每种载体蛋白能与特定的溶质分子结合，通过一系列构象改变介导溶质分子的跨膜转运(图 5－3)。20 世纪 50 年代中期，研究细菌单基因突变导致半乳糖跨膜运输阻断，从而发现了细菌质膜上负责 β－半乳糖转运的载体蛋白。在 *E. coli* 已经鉴定的基因中，有大约 20％的基因与编码膜转运蛋白相关。类似的基因突变在人的胱氨酸尿(cystinuria)遗传病患者中发现，这种病人的肾细胞和肠细胞不能将胱氨酸和半胱氨酸运入血液，导致其在尿中积累并在肾脏中形成胱氨酸结石。

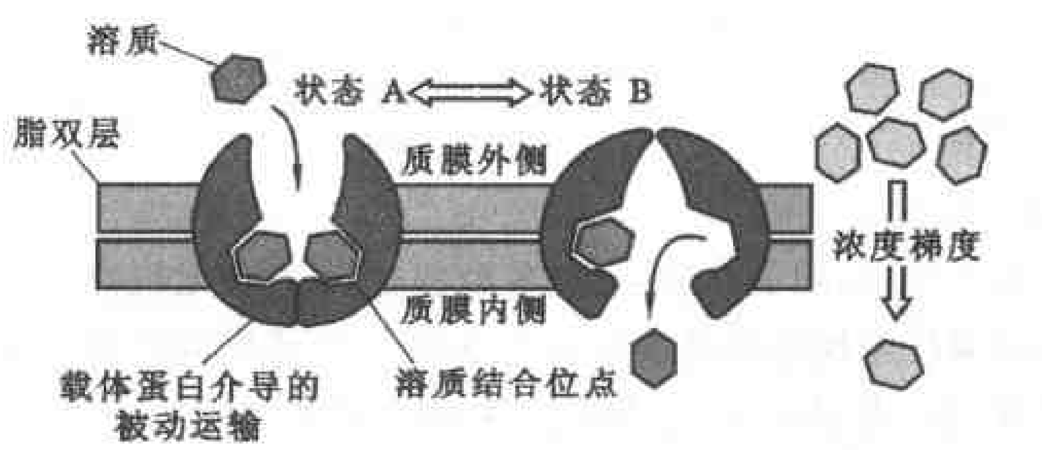


图 5－3　示载体蛋白通过构象改变介导溶质(葡萄糖)被动运输的假想模型

膜上的载体蛋白以两种构象状态存在：状态 A 时，溶质结合位点在膜外侧暴露，状态 B 时，同样的溶质结合位点在膜内侧暴露；该模型认为，两种构象状态的转变是随机发生而不依赖于是否有溶质结合和是否完全可逆，假如溶质浓度在膜外侧高，则状态 A→状态 B 的转换比状态 B→状态 A 的转换更常发生，因此溶质顺浓度梯度进入细胞

载体蛋白相当于结合在细胞膜上的酶，有特异性结合位点，可同特异性底物(溶质)结合，一种特异性载体只转运一种类型的分子或离子；转运过程具有类似于酶与底物作用的饱和动力学曲线；既可被底物类似物竞争性地抑制，又可被痕量的某种抑制剂非竞争性抑制以及对 pH 的依赖性等，因此有人将载体蛋白称为通透酶(permease)。与酶不同的是酶不能改变反应平衡点，只能增加达到反应平衡的速率，而载体蛋白可以改变过程的平衡点，加快物质沿自由能减少的方向跨膜运动的速率；此外与酶不同的是载体蛋白对转运的溶质分子不作任何共

价修饰。

2. 通道蛋白及其功能

通道蛋白所介导的被动运输不需要与溶质分子结合，横跨膜形成亲水通道，允许适宜大小的分子和带电荷的离子通过。目前发现的通道蛋白已有 100 余种，某些通道蛋白在革兰氏阴性细菌的外膜、线粒体或叶绿体的外膜上形成非选择性的通道。绝大多数的通道蛋白形成有选择性开关的多次跨膜通道，因为这些通道蛋白几乎都与离子的转运有关，所以又称为离子通道（表5－1）。离子通

表 5－1　离子通道的举例

离子通道	典型定位	功　能
K^+渗漏通道	大多数动物细胞的质膜	维持静息膜电位
电压门Na^+通道	神经细胞轴突的质膜	介导产生动作电位
电压门K^+通道	神经细胞轴突的质膜	起始动作电位后使膜恢复静息电位
电压门Ca^{2+}通道	神经终末的质膜	刺激神经递质释放，将电信号转换为化学信号
乙酰胆碱受体（乙酰胆碱门Na^+和Ca^{2+}通道）	肌肉细胞的质膜（神经－肌肉接头处）	兴奋性突触信号传递（在靶细胞将化学信号转换为电信号）
GABA 受体（GABA 门Cl^-通道）	许多神经元的质膜（突触处）	抑制性突触信号传递
压力激活的阳离子通道	内耳听觉毛细胞	检测声音震动

道具有两个显著特征：一是具有离子选择性，离子通道对被转运离子的大小与电荷都有高度的选择性，而且转运速率高，可达 10^6 个离子/s，其速率是已知任何一种载体蛋白的最快速率的 1 000 倍以上。驱动带电荷的溶质跨膜转运的净驱动力来自两种力的合力，一种是溶质的浓度梯度，另一种是跨膜电位差，这种净驱动力构成溶质跨膜的电化学梯度（electrochemical gradient），这种梯度决定溶质跨膜的被动运输的方向。第二个特征是离子通道是门控的，即离子通道的活

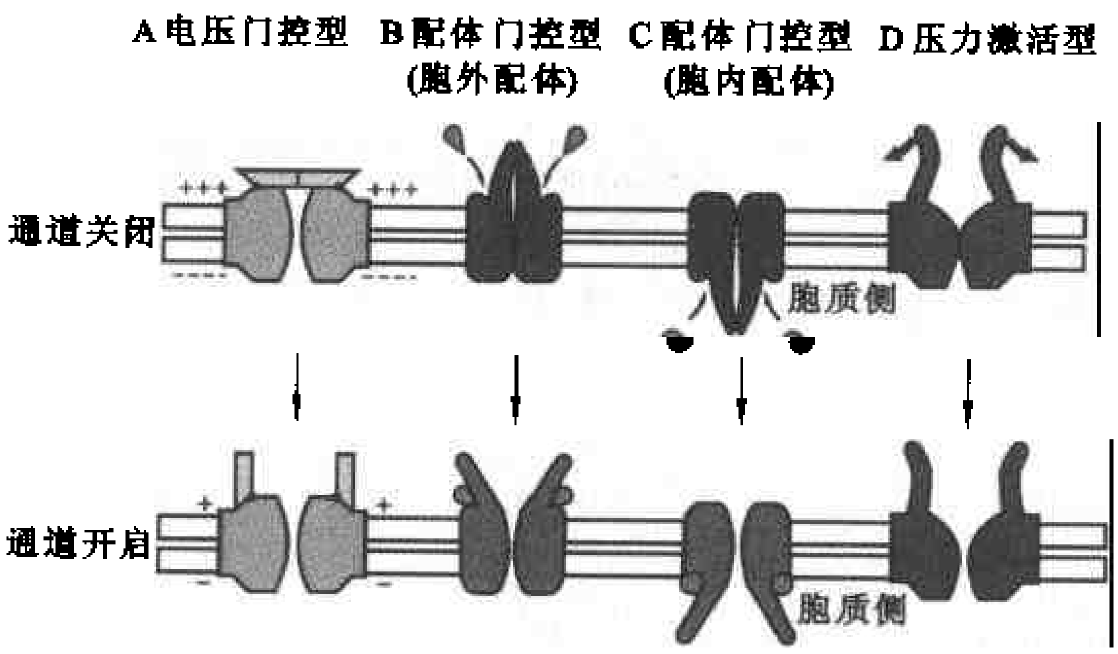


图 5－4　三种类型的门控离子通道示意图

A：电压门通道；B、C：配体门通道；D：压力激活通道

性由通道开或关两种构象所调节，并通过通道开关应答于适当的信号。多数情况下离子通道呈关闭状态，只有在膜电位变化、化学信号或压力刺激后，才开启形成跨膜的离子通道。因此离子通道又区分为电压门通道(voltage - gated channel)、配体门通道(ligand - gated channel)和压力激活通道(stress - activated channel)(图 5 - 4)。离子通道在神经元与肌细胞冲动传递过程中起重要作用。如含羞草的闭叶反应，草履虫的快速转向运动，内耳听觉的感应等都与离子通道有关。

二、主动运输

主动运输(active transport)是由载体蛋白所介导的物质逆浓度梯度或电化学梯度由浓度低的一侧向高浓度的一侧进行跨膜转运的方式。转运分子的自由能变化为正值，因此需要与某种释放能量的过程相偶联。根据主动运输过程所需能量来源的不同可归纳为由 ATP 直接提供能量和间接提供能量以及光能驱动的主动运输三种基本类型(图 5 - 5)。

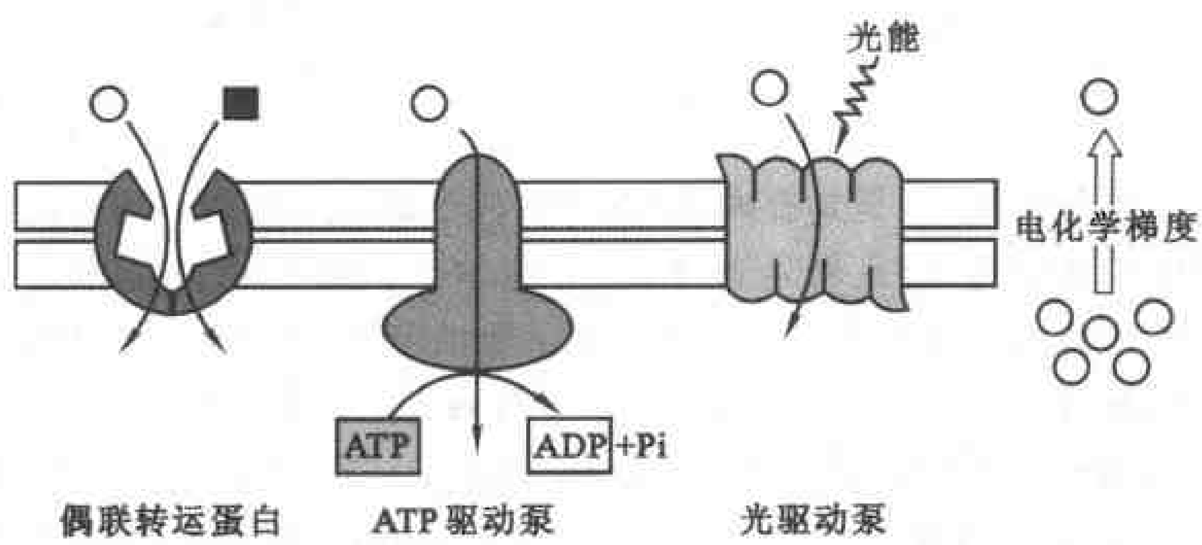


图 5 - 5　驱动主动运输的三种不同类型

表 5 - 2　典型哺乳类细胞内外离子浓度的比较

组　分	细胞内浓度/$mmol \cdot L^{-1}$	细胞外浓度/$mmol \cdot L^{-1}$
阳离子		
Na^+	5～15	145
K^+	140	5
Mg^{2+} *	0.5	1～2
Ca^{2+} *	10^{-4}	1～2
H^+	7×10^{-5}(pH7.2)	4×10^{-5}(pH7.4)
阴离子		
Cl^-	5～15	110
固定的阴离子 * *	高	0

* 给出的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度是胞质中的游离离子浓度，细胞中共有约 20 mmol/L Mg^{2+} 和 1～2 mmol/L Ca^{2+}，但大多数与蛋白质和其他底物结合，因此不能离开细胞，大多数的细胞总 Ca^{2+} 储存在不同的细胞器内

* * 固定的阴离子是带负电荷的大小不同的有机分子，它们被捕获在胞内，不能透过质膜

主动运输普遍存在于动植物细胞和微生物细胞。这些细胞的内外离子浓度是非常不同的，表明细胞膜具有逆浓度梯度进行主动运输的功能(表 5－2)。

(一) 由 ATP 直接提供能量的主动运输——钠钾泵

在细胞膜的两侧存在很大的离子浓度差，特别是阳离子浓度差。一般的动物细胞要消耗 1/3 的总 ATP 来维持细胞内低 Na^+ 高 K^+ 的离子环境，神经细胞则要消耗 2/3 的总 ATP，这种特殊的离子环境对维持细胞内正常的生命活动，对神经冲动的传递以及对维持细胞的渗透平衡，恒定细胞的体积都是非常必要的。K^+ 和 Na^+ 电压门逆浓度与电化学梯度输入和输出的跨膜转运是一种典型的主动运输方式，它是由 ATP 直接提供能量，通过细胞膜上的 Na^+-K^+ 泵(Na^+-K^+ pump)来完成的。

Na^+-K^+ 泵由 α 和 β 二个亚基组成，α 亚基的相对分子质量为 120×10^3，是一个跨膜多次的整合膜蛋白，具有 ATP 酶活性，因此 Na^+-K^+ 泵又称为 Na^+-K^+ ATP 酶。β 亚基的相对分子质量为 50×10^3，是具有组织特异性的糖蛋白。其工作模式是在细胞内侧 α 亚基与 Na^+ 相结合促进 ATP 水解，α 亚基上的一个天门冬氨酸残基磷酸化引起 α 亚基构象发生变化，将 Na^+ 泵出细胞，同时细胞外的 K^+ 与 α 亚基的另一位点结合，使其去磷酸化，α 亚基构象再度发生变化将 K^+ 泵进细胞，完成整个循环。Na^+ 依赖的磷酸化和 K^+ 依赖的去磷酸化引起构象变化有序交替发生，每秒钟可发生 1 000 次左右构象变化。每个循环消耗一个 ATP 分子，泵出 3 个 Na^+ 和泵进 2 个 K^+(图 5－6)。极少量的乌本苷(ouabain)便可抑制 Na^+-K^+ 泵的活性(乌本苷的半数抑制量 I_{50} 为 1μmol/L)，而 Mg^{2+} 和少量的膜脂有助于 Na^+-K^+ 泵活性的提高。生物氧化抑制剂如氰化物使 ATP 供应中断，结果 Na^+-K^+ 泵失去能源以致停止工作。

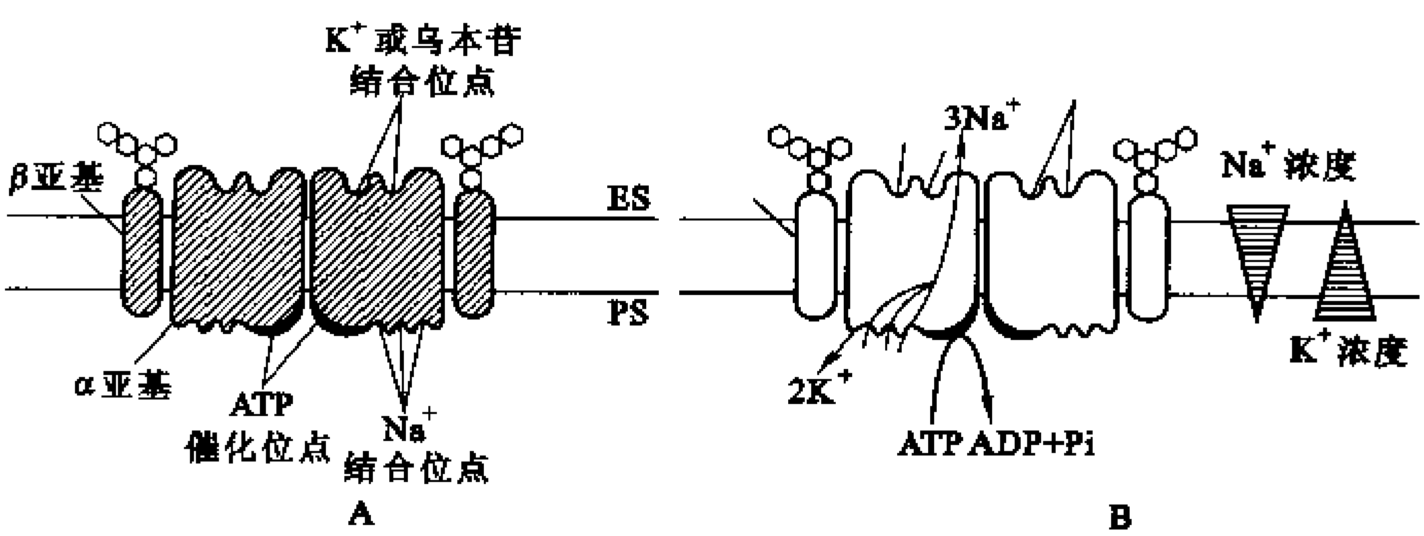


图 5－6　Na^+-K^+ 泵的结构 A 与工作模式 B 示意图

Na^+-K^+ 泵存在于一切动物细胞的细胞膜上。根据实验结果推测，在红细胞表面大约有 250 个 Na^+-K^+ 泵单位，其密度为 1～2 个/μm^2，其他细胞中 Na^+-K^+ 泵密度为 10^3 个/μm^2 左右。动物细胞靠 ATP 水解供能驱动 Na^+-K^+ 泵工作，结果造成质膜两侧的 K^+、Na^+ 不均匀分布，有助于维持动物细胞的渗透平衡。细胞的生命活动需要这种特定和相对稳定的离子浓度。由于质膜对

水的可透性，水会从低溶质浓度一侧（高水浓度）向高溶质浓度一侧（低水浓度）运动，这种运动称为渗透。水分子运动的驱动力等于跨膜水压的差异，称为渗透压（osmotic pressure）。在无任何相反压力时，水向细胞的渗透运动将使细胞膨胀甚至破裂。不同细胞用不同的机制解决这种危机。动物细胞借助 Na^+-K^+ 泵维持渗透平衡；植物细胞以其坚韧的细胞壁防止膨胀和破裂，于是能耐受较大的跨膜渗透差异，并具有相应的生理功能，如保持植物茎坚挺，调节通过气孔的气体交换等；生活在水中的一些原生动物（如草履虫），通过收缩胞收集和排除过量的水。但对大多数细胞而言，Na^+-K^+ 泵对保持渗透平衡是十分关键的（图 5－7）。此外，胞外高浓度的 Na^+ 代表大量的能量储存，即使用乌本苷人为停止 Na^+-K^+ 泵工作，储存的能量也可维持由 Na^+ 驱动的其他运输过程工作数分钟。

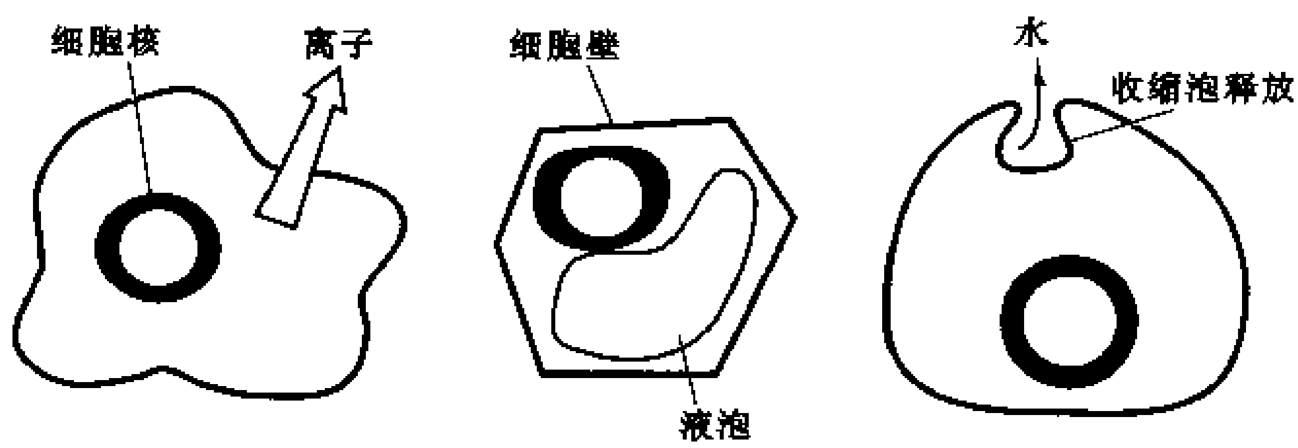


图 5－7 细胞以三种不同的机制避免渗透膨胀

A：动物细胞通过泵出离子维持细胞内低浓度溶质；B：植物细胞依靠细胞壁避免膨胀和破裂；C：原生动物通过收缩胞定时排出进入细胞过量的水而避免膨胀

（二）由 ATP 直接提供能量的主动运输——钙泵和质子泵

钙泵（Ca^{2+} pump）又称 Ca^{2+}－ATP 酶，对细胞基本功能具有重要作用。Ca^{2+} 泵是由 1 000 个氨基酸残基组成的多肽构成的跨膜蛋白，相对分子质量 100×10^3，与 Na^+-K^+ 泵的 α 亚基同源，每一泵单位中有约 10 个跨膜 α 螺旋，可能它们有共同的进化来源。细胞内钙调蛋白与之结合以调节 Ca^{2+} 泵的活性。Ca^{2+} 泵工作与 ATP 的水解相偶联，每消耗一个 ATP 分子转运出两个 Ca^{2+}。钙泵主要存在于细胞膜和内质网膜上，它将 Ca^{2+} 输出细胞或泵入内质网腔中储存起来，以维持细胞内低浓度的游离 Ca^{2+}（一般细胞内游离 Ca^{2+} 浓度约 10^{-7}mol/L，细胞外为 10^{-3}mol/L）。钙泵在肌质网内储存 Ca^{2+}，对调节肌细胞的收缩与舒张是至关重要的。

植物细胞、真菌（包括酵母）和细菌细胞其质膜上没有 Na^+-K^+ 泵，而是具有 H^+ 泵（H^+ ATPase），将 H^+ 泵出细胞，建立跨膜的 H^+ 电化学梯度（取代动物细胞 Na^+ 的电化学梯度），驱动转运溶质进入细胞。例如，细菌细胞对糖和氨基酸的摄入主要是由 H^+ 驱动的同向运输完成的。在这一过程中，H^+ 泵的工作也

产生细胞周围基质中的酸性 pH。在一些光合细菌中，H^+ 电化学梯度由光驱动的 H^+ 泵（如细菌视紫红质）活性建立。

质子泵可分三种：一种与 Na^+-K^+ 泵和 Ca^{2+} 泵结构类似，在转运 H^+ 的过程中涉及磷酸化和去磷酸化，存在于真核细胞的细胞膜上，称 P 型质子泵；第二种存在于动物细胞溶酶体膜和植物细胞液泡膜上，转运 H^+ 过程中不形成磷酸化的中间体，称 V 型质子泵，其功能是从细胞质基质中泵出 H^+ 进入细胞器，有助于保持细胞质基质中性 pH 和细胞器内的酸性 pH；第三种存在于线粒体内膜、植物类囊体膜和多数细菌质膜上，它以相反的方式来发挥其生理作用，即 H^+ 顺浓度梯度运动，将所释放的能量与 ATP 合成偶联起来，如线粒体的氧化磷酸化和叶绿体的光合磷酸化作用，因此称为 H^+-ATP 酶更合适。

（三）协同运输

协同运输（cotransport）是一类由 Na^+-K^+ 泵（或 H^+ 泵）与载体蛋白协同作用，靠间接消耗 ATP 所完成的主动运输方式。物质跨膜运动所需要的直接动力来自膜两侧离子电化学浓度梯度，而维持这种离子电化学梯度则是通过 Na^+-K^+ 泵（或 H^+ 泵）消耗 ATP 所实现的。动物细胞的协同运输是利用膜两侧的 Na^+ 电化学梯度来驱动的，而植物细胞和细菌常利用 H^+ 电化学梯度来驱动。

根据物质运输方向与离子顺电化学梯度的转移方向的关系，协同运输又可分为共运输（symport）和对向运输（antiport）。共运输是物质运输方向与离子转移方向相同，如小肠上皮细胞和肾小管上皮细胞吸收葡萄糖或氨基酸等有机物，就是伴随 Na^+ 从细胞外流入细胞内而完成的。完成共运输的载体蛋白有两个结合位点，必须同时与 Na^+ 和特异的氨基酸或葡萄糖分子结合才能进行共运输（图 5-8，图 5-9）。

在某些细菌中，乳糖的吸收则伴随 H^+ 从细胞膜外进入细胞，每转移一个 H^+，吸收一个乳糖分子，这些过程也都由特异的载体蛋白来完成。

对向运输是指物质跨膜转运的方向与离子转移的方向相反，如动物细胞常通过 Na^+ 驱动的 Na^+-H^+ 对向运输的方式来转运 H^+ 以调节细胞内的 pH。细胞内特定的 pH 是细胞正常代谢活动所需要的，在不分裂的细胞内 pH 为 7.1～7.2，当细胞受到生长因子等刺激后，细胞内 pH 由 7.2 提高到 7.4，细胞开始生长与分裂。在这一过程中，细胞中的 H^+ 减少约 40%，主要由细胞膜上的 Na^+-H^+ 交换载体完成，即 H^+ 输出伴随 Na^+ 进入细胞。在线粒体中，Na^+-H^+ 对向运输是由 H^+ 电化学梯度驱动的，将 Na^+ 由内膜的基质一侧转运出来。

综上所述，主动运输都需要消耗能量，所需能量可直接来自 ATP 或来自离子电化学梯度；同样也需要膜上的特异性载体蛋白，这些载体蛋白不仅具有结构上的特异性（各种特异的结合位点），而且具有结构上的可变性（构象变化影响亲和力的改变）。细胞运用各种不同的方式通过不同的体系在不同的条件下完成小分子物质的跨膜运动。

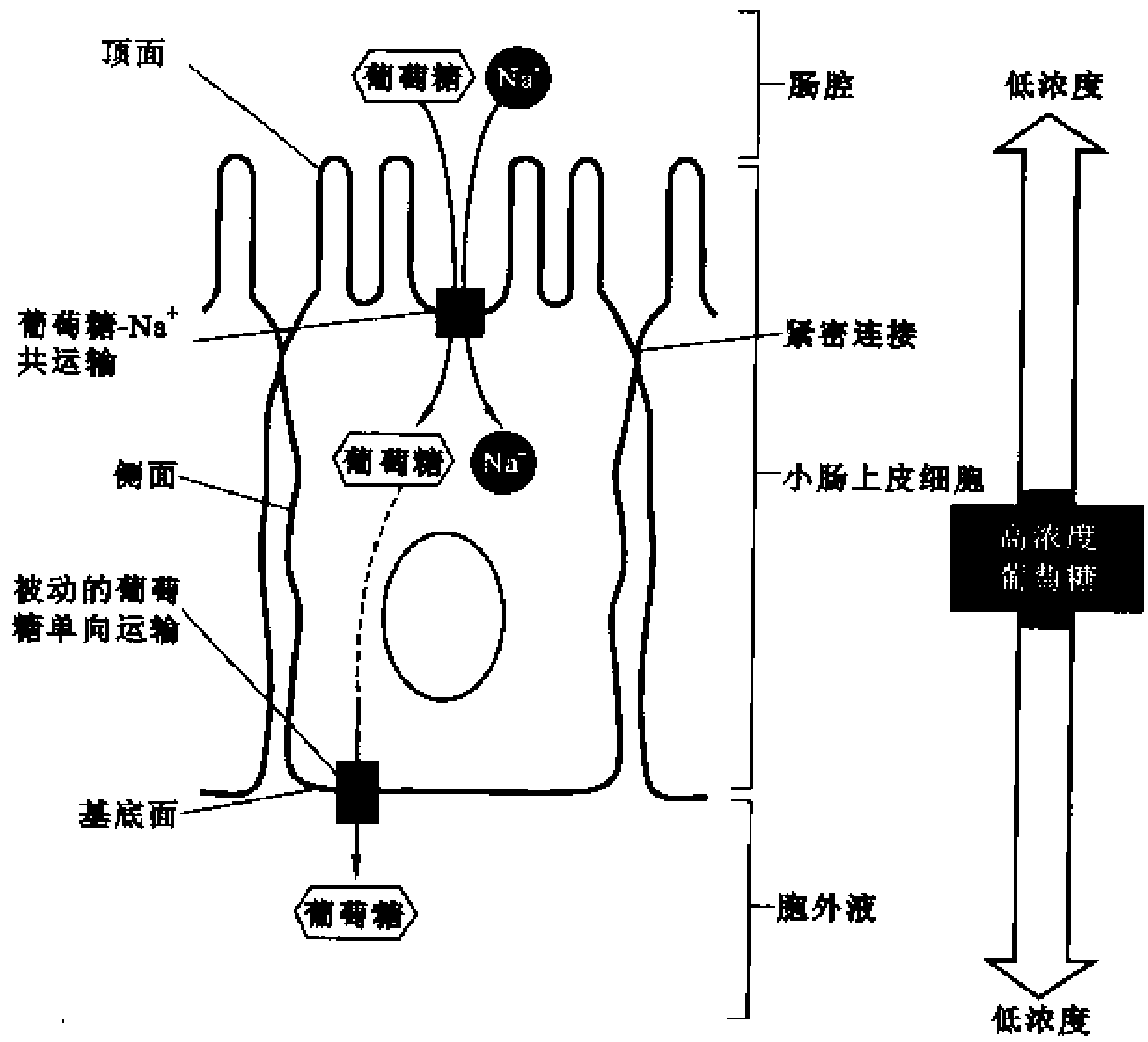


图 5－8　小肠上皮细胞吸收葡萄糖(Glc)示意图

葡萄糖分子通过 Na^+ 驱动的共运输方式进入上皮细胞；再经载体介导的协助扩散方式进入血液；Na^+-K^+ 泵消耗 ATP 维持 Na^+ 的电化学梯度

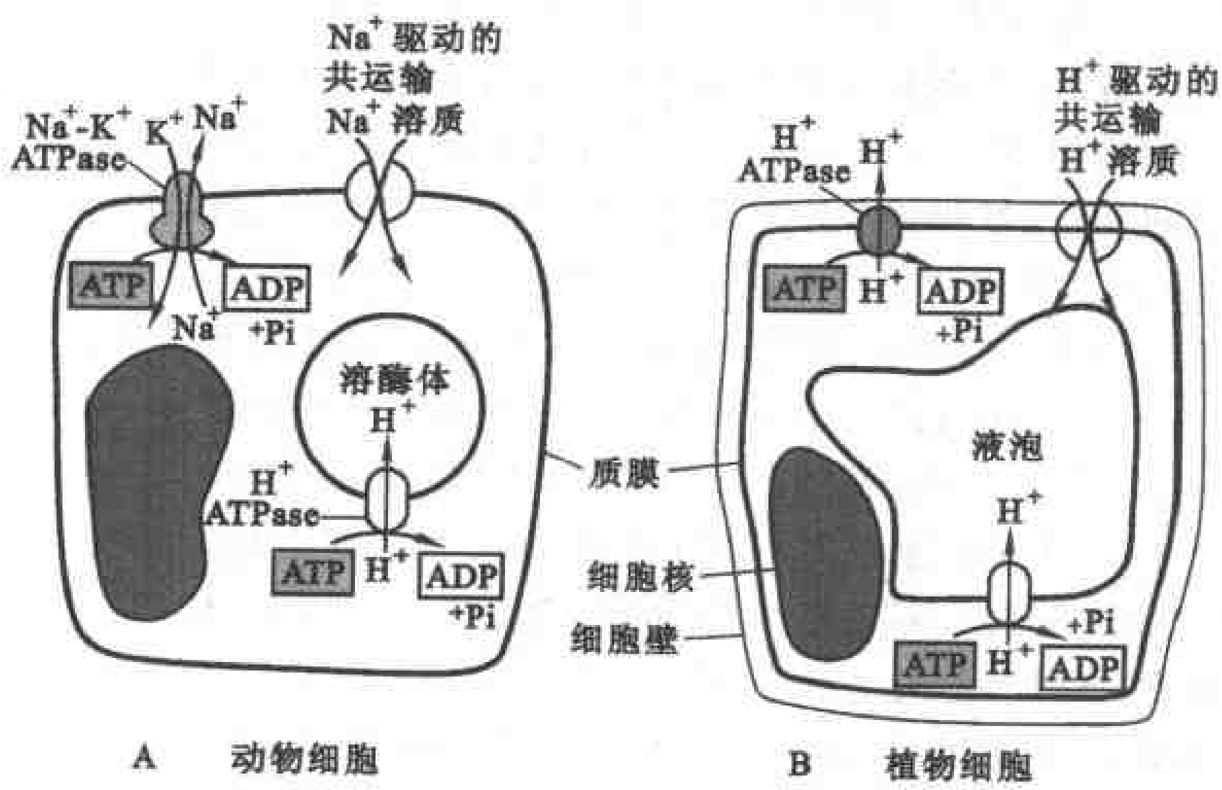


图 5－9　Na^+-K^+ 泵(或 H^+ 泵)与载体蛋白协同运输的示意图

A：动物细胞 Na^+ 驱动的共运输；B：植物细胞 H^+ 驱动的共运输示意图

（四）物质的跨膜转运与膜电位

不同方式的物质跨膜运动，其结果是产生并维持了膜两侧不同物质特定的浓度分布。对某些带有电荷的物质，特别是对离子来说，就形成了膜两侧的电位差。插入细胞微电极便可测出细胞膜两侧各种带电物质形成的电位差的总和，即膜电位。人们对神经元等可兴奋细胞的膜电位及其变化的机制进行了大量的研究，在静息状态下的膜电位称静息电位(resting potential)；在刺激作用下产生行使通讯功能的快速变化的膜电位称动作电位(active potential)。静息电位是细胞膜内外相对稳定的电位差，质膜内为负值，质膜外为正值，这种现象又称极化(polarization)。在动物细胞中，根据不同生物和不同细胞类型，静息膜电位变化范围在 −20 mV～−200 mV 之间。

静息电位主要是由质膜上相对稳定的离子跨膜运输或离子流形成的。Na^+−K^+泵的工作使细胞内外的 Na^+ 和 K^+ 浓度远离平衡态分布，胞内高浓度的 K^+ 是细胞内有机分子所带负电荷的主要平衡者。然而质膜也含有一套 K^+ 渗漏通道，当通道打开时，通过协助扩散允许 K^+ 顺电化学梯度流向胞外。处于静息状态的细胞，质膜上 K^+ 渗漏通道对 K^+ 比其他离子更具通透性，随着正电荷转移到胞外而留下胞内的非平衡负电荷，结果是膜外正离子过量和膜内负离子过量，从而产生静息膜电位。动物细胞的静息膜电位值主要反应了跨膜的 K^+ 电化学梯度。

质膜对 K^+ 的通透性大于 Na^+ 是静息电位产生的主要原因，Cl^- 甚至细胞中的蛋白质分子(一般净电荷为负值)对静息电位的大小也有一定的影响。Na^+−K^+泵对静息电位的相对恒定起重要的作用。

Na^+ 和 K^+ 离子通道都是膜上的电压门离子通道，它们的开关变化应答于膜电位的变化，或者说电压门通道打开的概率由膜电位控制。电压门离子通道在神经细胞电信号的传导中具有重要作用，它们也存在于其他许多细胞中，包括肌肉细胞、卵细胞、原生动物甚至植物细胞。电压门离子通道有特殊的带电荷的蛋白结构域，称为电压感受器(voltage sensors)，对膜电位的变化极端敏感，从而控制通道蛋白转换它的关—开构象。于是，在含有许多通道蛋白分子的膜片内，可能发现当膜处于某一电位时，平均 10％的通道是打开的，而处于另一电位时，90％的通道是打开的。

当细胞接受刺激信号(电信号或化学信号)超过一定阈值时，电位门 Na^+ 通道将介导细胞产生动作电位。细胞接受阈值刺激，Na^+ 通道打开，引起 Na^+ 通透性大大增加，瞬间大量 Na^+ 流入细胞内，致使静息膜电位减小乃至消失，即为质膜的去极化过程(depolarization)，Na^+ 进一步增加达到 Na^+ 平衡电位，形成瞬间的内正外负的动作电位，称质膜的反极化，动作电位随即达到最大值。只有达到一定的刺激阈，动作电位才会出现，这是一种全或无的正反馈阈值。在 Na^+ 大量进入细胞时，K^+ 通透性也逐渐增加，随着动作电位出现，Na^+ 通道从失活到关闭，电位门 K^+ 通道完全打开，K^+ 流出细胞从而使质膜再度极化，以至于超过原来的静息电位，此时称超极化(super polarization)。超极化时膜电位使 K^+ 通道

关闭，膜电位又恢复至静息状态（图 5－10）。

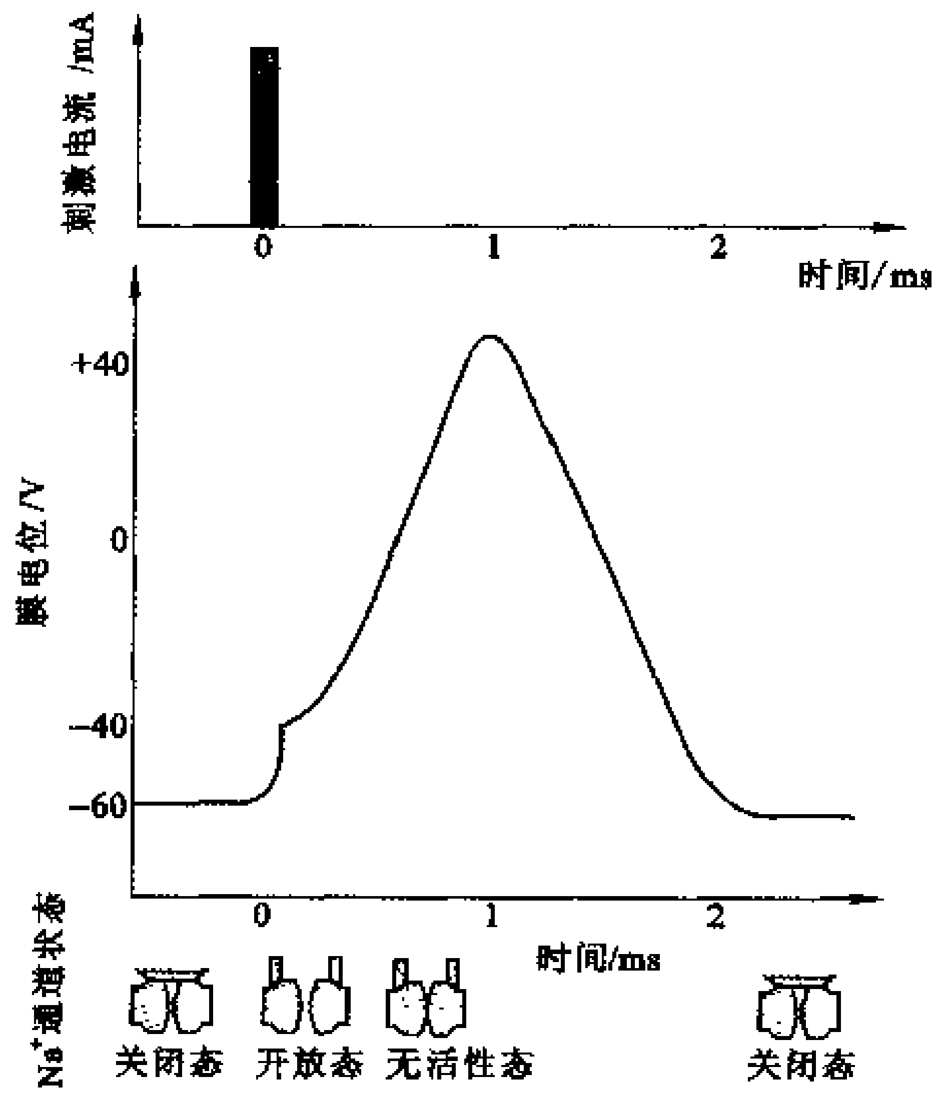


图 5－10　离子流与动作电位的关系示意图

膜电位不仅与质膜对 K^+ 和 Na^+ 不同的通透性有关，而且质膜上的 Na^+、K^+ 通道蛋白及 Na^+-K^+ 泵等膜蛋白随膜电位变化有规律地关启。细胞膜膜电位具有重要的生物学意义，特别是在神经、肌肉等可兴奋细胞中，是化学信号或电信号引起的兴奋传递的重要方式。其细节请参阅生理学教材。

三、胞吞作用与胞吐作用

真核细胞通过胞吞作用（endocytosis）和胞吐作用（exocytosis）完成大分子与颗粒性物质的跨膜运输，如蛋白质、多核苷酸、多糖等。在转运过程中，物质包裹在脂双层膜围绕的囊泡中，因此又称膜泡运输。在这种形式的运输过程中涉及膜的融合与断裂，因此也需要消耗能量，属于主动运输。这种运输方式常常可同时转运一种或一种以上数量不等的大分子和颗粒性物质，因此也有人称之为批量运输（bulk transport）。

（一）胞饮作用与吞噬作用

胞吞作用是通过细胞膜内陷形成囊泡，称胞吞泡（endocytic vesicle），将外界物质裹进并输入细胞的过程。根据形成的胞吞泡的大小和胞吞物质，胞吞作用又可分为两种类型：胞吞物若为溶液，形成的囊泡较小，则称为胞饮作用

(pinocytosis)。若胞吞物为大的颗粒性物质(如微生物和细胞碎片),形成的囊泡较大,则称为吞噬作用(phagocytosis)。胞饮作用形成的胞吞泡又称胞饮泡,吞噬作用形成的胞吞泡称吞噬泡。

胞饮作用与吞噬作用主要有三点区别:

1. 胞吞泡的大小不同,胞饮泡直径一般小于 150 nm,而吞噬泡直径往往大于 250 nm。

2. 所有真核细胞都能通过胞饮作用连续摄入溶液和分子,而大的颗粒性物质则主要是通过特殊的吞噬细胞摄入的;前者是一个连续发生的过程,后者首先需要被吞噬物与细胞表面结合并激活细胞表面受体,因此是一个信号触发过程(triggered process)。

3. 胞吞泡形成机制不同

胞饮泡的形成需要网格蛋白(clathrin)或这一类蛋白的帮助。网格蛋白是由相对分子质量为 180×10^3 的重链和 $35\times10^3\sim40\times10^3$ 的轻链组成的二聚体,三个二聚体形成组成包被的结构单位——三脚蛋白复合物(triskelion)。当配体与膜上受体结合后,网格蛋白聚集在膜下的一侧,逐渐形成直径 50~100 nm 的质膜凹陷,称网格蛋白有被小窝(clathrin coated pit);一种小分子 GTP 结合蛋白(dynamin)在深陷有被小窝的颈部装配成环,dynamin 蛋白水解与其结合的 GTP 引起颈部缢缩,最终脱离质膜形成网格蛋白有被小泡 (clathrin coated vesicle);几秒钟后,网格蛋白便脱离有被小泡返回质膜附近重复使用,去被的囊泡与早胞内体(early endosome)融合,将转运分子与部分胞外液体摄入细胞。

在大分子跨膜转运中,网格蛋白本身并不起捕获特异转运分子的作用,有特异性选择作用的是包被中另一类接合素蛋白(adaptin),它既能结合网格蛋白,又能识别跨膜受体胞质面的尾部肽信号(peptide signal),从而通过网格蛋白有被小泡介导跨膜受体及其结合配体的选择性运输(图 5-11)。在膜泡运输中,不同途径的转运小泡可能结合不同的包被蛋白,除网格蛋白有被小泡外,还有一类

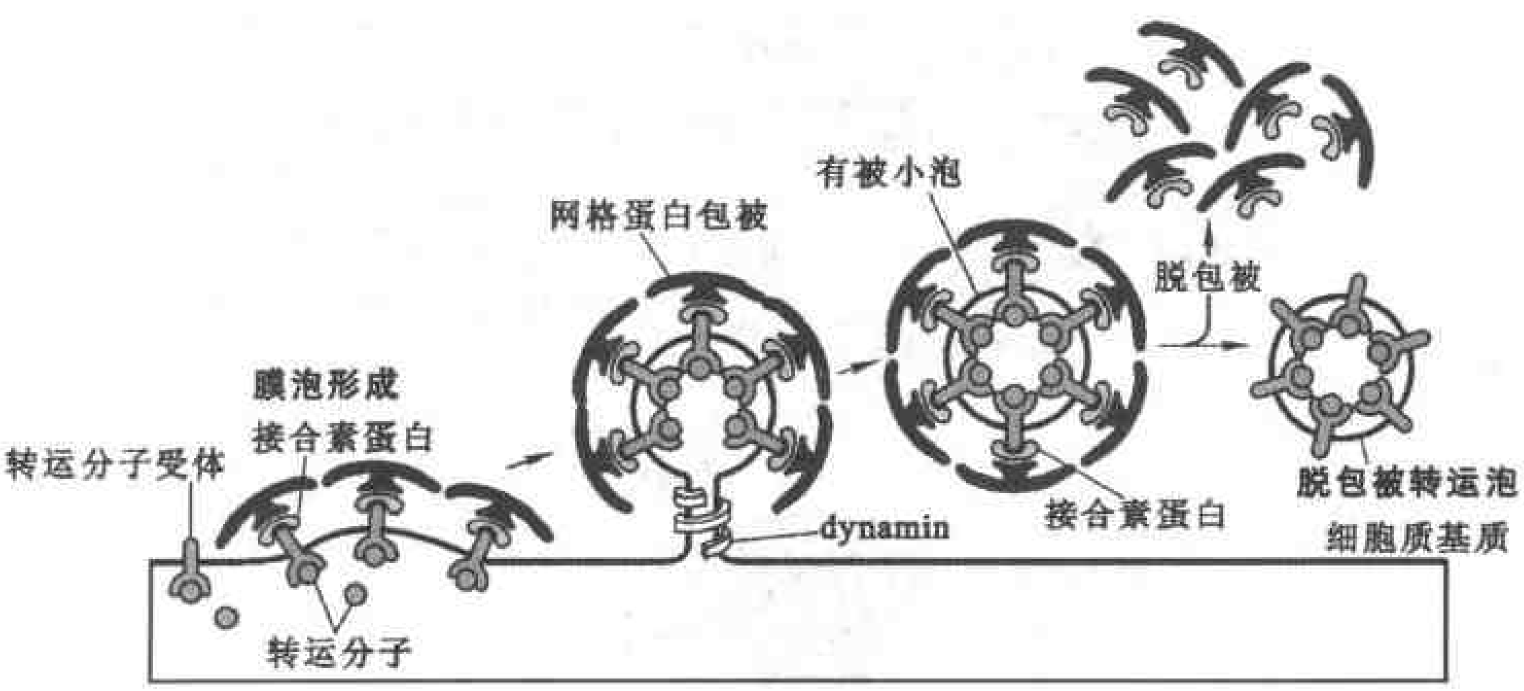


图 5-11　通过网格蛋白有被小泡介导的选择性运输示意图

COP蛋白有被小泡(COP-coated vesicle),介导内质网和高尔基体之间非选择性的膜泡运输;同样接合素蛋白至少也有两类:一类与网格蛋白结合,负责受体介导的胞吞作用;另一类也与网格蛋白结合,但负责高尔基体向溶酶体的膜泡运输。

吞噬泡的形成则需要有微丝及其结合蛋白的帮助,如果用降解微丝的药物(细胞松弛素B)处理细胞,则可阻断吞噬泡的形成,但胞饮作用仍继续进行。吞噬作用是很多原生动物摄取营养的一种方式,但在多细胞动物体内,只有某些特化细胞,如组织中的巨噬细胞和血液中的中性粒细胞才具有吞噬功能,它们在防御微生物的侵染和清除衰老细胞或细胞碎片方面起重要作用。

(二) 受体介导的胞吞作用

根据胞吞的物质是否有专一性,可将胞吞作用分为受体介导的胞吞作用(receptor mediated endocytosis)和非特异性的胞吞作用。受体介导的胞吞作用是大多数动物细胞通过网格蛋白有被小泡从胞外液摄取特定大分子的有效途径。被转运的大分子物质(配体)首先与细胞表面互补性的受体相结合,形成受体-大分子复合物并扳动内化作用(internalization)。首先是该处质膜部位在网格蛋白参与下形成有被小窝(coated pits),然后是深陷的小窝脱离质膜形成有被小泡(coated vesicles)。受体介导的胞吞作用是一种选择浓缩机制(selective concentrating mechanism),既可保证细胞大量地摄入特定的大分子,同时又避免了吸入细胞外大量的液体。与非特异性的胞吞作用相比,可使特殊大分子的内化效率增加1 000多倍。一个重要的例子是动物细胞通过受体介导的胞吞作用对胆固醇的摄取(图5-12),鸟类卵细胞摄取卵黄蛋白,肝细胞摄入转铁蛋白。某些激素如胰岛素与靶细胞表面受体结合进入细胞,巨噬细胞通过表面受体对免疫球蛋白及其复合物、病毒、细菌乃至衰老细胞的识别和摄入,以及其他一些基本代谢物如合成血红蛋白所必需的维生素B_{12}和铁的摄取都是通过受体介导的胞吞作用进行的。

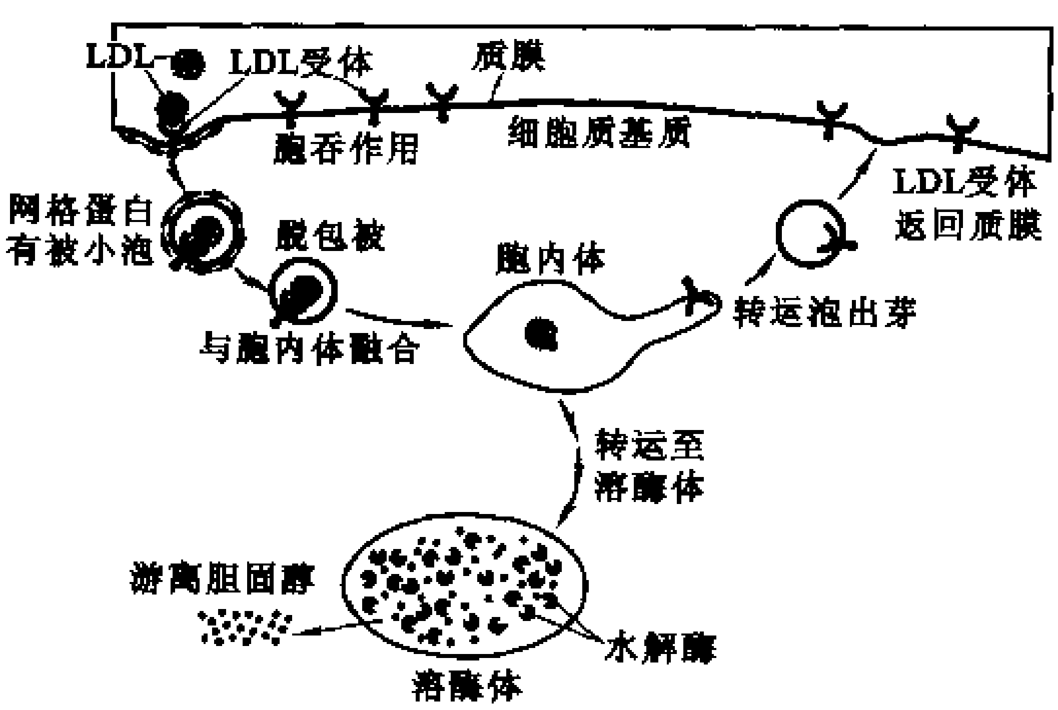


图5-12　LDL的受体介导的胞吞作用

胆固醇主要在肝细胞中合成，随后与磷脂和蛋白质形成相对分子质量为 3×10^6、直径为 22 nm 的复合物，即低密度脂蛋白(low-density lipoproteins，LDL)进入血液，通过与细胞表面的低密度脂蛋白受体特异地结合形成受体 - LDL 复合物，几分钟内便通过网格蛋白有被小泡的内化作用进入细胞，经脱被作用并与胞内体(endosome)融合。胞内体是动物细胞内由膜包围的细胞器，其作用是传输由胞吞作用新摄入的物质到溶酶体被降解。胞内体膜上有 ATP 驱动的质子泵，将 H^+ 泵进胞内体腔中，使腔内的 pH 降低(pH5～6)，从而引起 LDL 与受体分离。胞内体以出芽的方式形成运载受体的小囊泡，返回细胞质膜，受体重复使用。然后含有 LDL 的胞内体与溶酶体融合，低密度脂蛋白被水解，释放出胆固醇和脂肪酸供细胞利用。

在细胞胞吞过程中，胞内体被认为是膜泡运输的主要分选站之一，其中的酸性环境在分选过程中起关键作用。已知有 25 种以上的不同受体，具有不同的分选信号，参与不同类型分子的受体介导的胞吞作用。在受体介导的胞吞作用过程中，不同类型的受体具有不同的胞内体分选途径：① 大部分受体返回它们原来的质膜结构域，如上面讨论过的 LDL 受体又循环到质膜再利用；② 有些受体不能再循环而是最后进入溶酶体，在那里被消化，如与表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)结合的细胞表面受体，大部分在溶酶体被降解，从而导致细胞表面 EGF 受体浓度降低，称为受体下行调节(receptor down-regulation)；③ 有些受体被运至质膜不同的结构域，该过程称作跨细胞的转运(transcytosis)。在具有极性的上皮细胞，这是一种将胞吞作用与胞吐作用相结合的物质跨膜转运方式，即转运的物质通过胞吞作用从上皮细胞的一侧被摄入细胞，再通过胞吐作用从细胞的另一侧输出。如母鼠的抗体从血液通过上皮细胞进入母乳中，乳鼠肠上皮细胞将抗体摄入体内，都是通过跨细胞的转运完成的。

(三) 胞吐作用

与细胞的胞吞作用相反，胞吐作用是将细胞内的分泌泡或其他某些膜泡中的物质通过细胞质膜运出细胞的过程。所有真核细胞都有从高尔基体反面管网区分泌的囊泡向质膜流动并与之融合的稳定过程，通过这种组成型的胞吐途径(constitutive exocytosis pathway)，新合成的囊泡膜的蛋白和脂类不断地供应质膜更新，正是这条途径确保细胞分裂前质膜的生长；囊泡内可溶性蛋白分泌到细胞外，有的成为质膜外周蛋白，有的形成胞外基质组分，有的作为营养成分或信号分子扩散到胞外液。真核细胞除了这种连续的组成型胞吐途径之外，特化的分泌细胞还有一种调节型胞吐途径(regulated exocytosis pathway)，这些分泌细胞产生的分泌物(如激素、粘液或消化酶)储存在分泌泡内，当细胞在受到胞外信号刺激时，分泌泡与质膜融合并将内含物释放出去(图 5 - 13)。

组成型的胞吐途径通过一种称为 default pathway 的方式来完成蛋白质的转运过程。这种模式认为，在糙面内质网中合成的蛋白质除了某些有特殊标志的蛋白驻留在 ER 或高尔基体中或选择性地进入溶酶体和调节性分泌泡外，其余的蛋白均沿着糙面内质网→高尔基体→分泌泡→细胞表面这一途径完成其转运

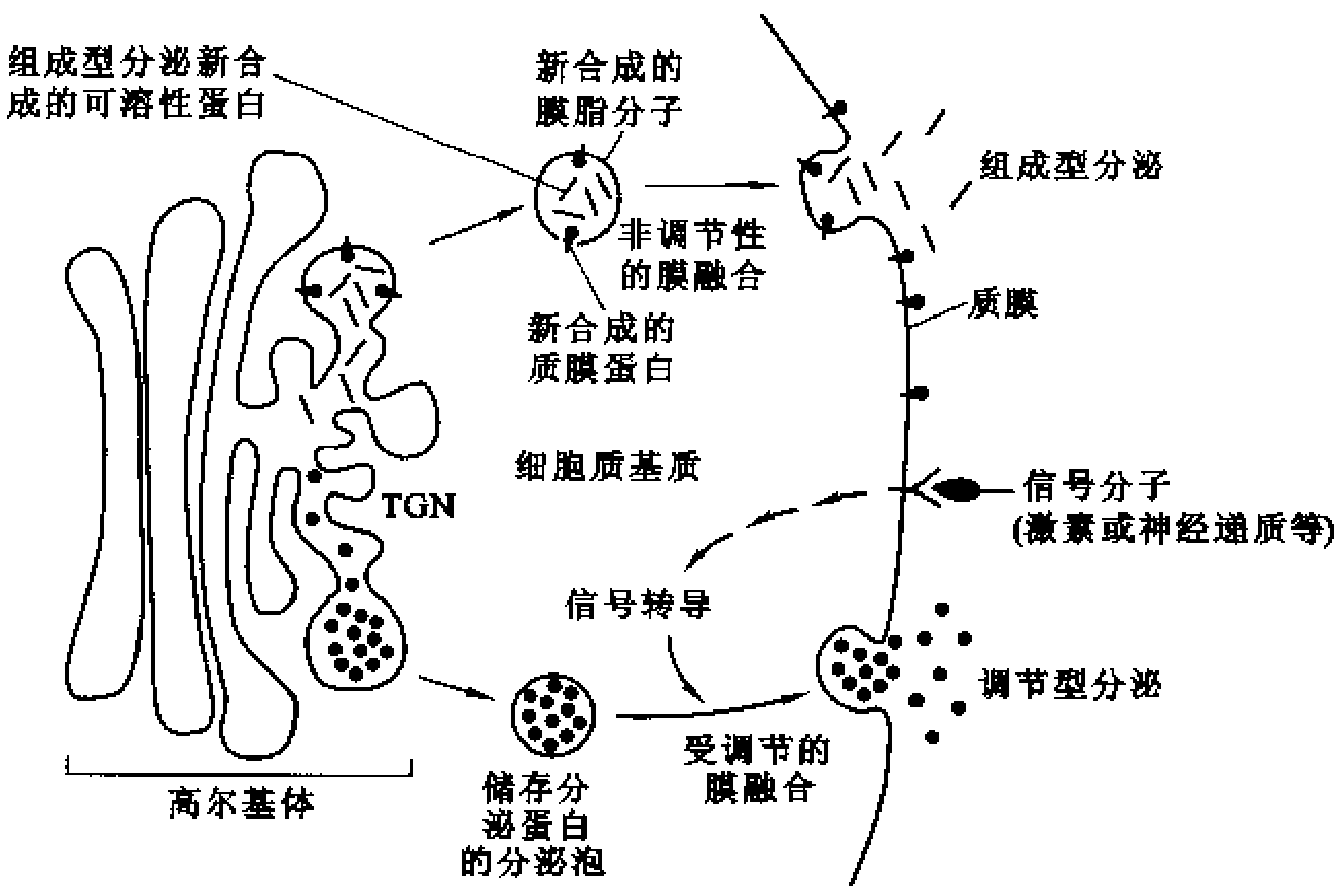


图 5-13　细胞组成型和调节型胞吐途径

这两条途径起始于高尔基体反面管网区，组成型胞吐途径存在于所有细胞，调节型胞吐途径仅存在于特化的分泌细胞

过程。一些实验支持这种推测，如将含有糖基化信号的三肽 Asn－Tyr－Thr 分子加入体外培养细胞的营养液中，这种小肽可穿过细胞膜，进入细胞质基质，甚至进一步进到内质网腔中，并被糖基化。N－连接寡糖的修饰阻碍它返回细胞质基质中，在 10 min 内就可从糙面内质网经高尔基体转运到细胞表面。这可能是质膜蛋白的最快的转运速度。

调节型的胞吐途径存在于特殊机能的细胞中。所有的哺乳动物细胞可能都采用共同的机制，其分选信号存在于蛋白本身，而蛋白的分选可能主要由高尔基体 TGN 上的受体类蛋白来决定。例如已知脑垂体细胞分泌促肾上腺皮质激素，胰岛的 β 细胞分泌胰岛素，胰腺的腺泡细胞分泌胰蛋白酶原，这三种分泌产物均分别储存在各自细胞的可调节性分泌泡中。用基因重组技术在垂体肿瘤细胞系中同时表达胰岛素与胰蛋白酶原，结果发现三种产物都存在于同一可调节性分泌泡中，并在相应的激素信号作用下向细胞外分泌。

现已在胰腺细胞的高尔基体膜囊中分离出相对分子质量为 25×10^3 的蛋白。在 pH7 时，它与分选到可调节性分泌泡中的蛋白有高的亲和力，而不与进入连续分泌泡的分泌蛋白结合。在 pH5.5 时，它与结合的配基分离。已发现一些可调节性分泌泡如胰岛素的分泌泡中的 pH 就是 5.5 左右。可调节性分泌泡在激素、神经递质或其他物质的作用下向细胞外分泌，常常是通过 Ca^{2+} 浓度的增加而启动分泌。除此之外，还存在一种不依赖于 Ca^{2+} 的途径，目前尚了解不多。

真核细胞无论是通过胞吞作用摄取大分子还是通过胞吐作用分泌大分子，都是通过膜泡运输的方式进行的，并且转运的囊泡只与特定的靶膜融合，从而保

证了物质有序地跨膜转运。此外,当分泌泡或转运泡与质膜融合并通过胞吐作用释放其内含物后,会使质膜表面积增加,但可能同时发生在质膜其他区域的胞吞作用则减少其表面积,这种动态过程对质膜更新和维持细胞的生存与生长是必要的。

无论是胞吞作用还是胞吐作用,一旦转运囊泡识别靶膜并停泊在那里之后,下一步即涉及到膜的融合过程,以卸掉囊泡内含物。在正常情况下,细胞膜不能自发地融合,只有除去亲水膜表面的水分子使膜之间的距离近至 1.5 nm,才有可能发生膜融合。显然这是一种在能量上高度不利的过程,因此,推测在细胞的胞吞或胞吐过程中有某种膜融合蛋白(fusion protein)参与催化,以克服质膜融合过程中的能量障碍。现在已鉴定多种胞质蛋白对膜泡融合是需要的,但仍不了解它们如何发挥作用。已对两种融合蛋白参与介导膜泡的融合过程较清楚:一种是 *N* - 乙基顺丁烯二酰亚胺 - 敏感融合蛋白(*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein,NSF),是一种 ATP 酶;另一种是可溶性 NSF 连接蛋白 SNAPs。在囊泡停靠位点,SNAPs 识别并结合囊泡膜上的受体 v-SNARE 和靶膜上受体 t-SNARE,启动融合复合物(fusion complex)的装配,膜融合复合物催化囊泡与靶膜的融合(图 5-14)。

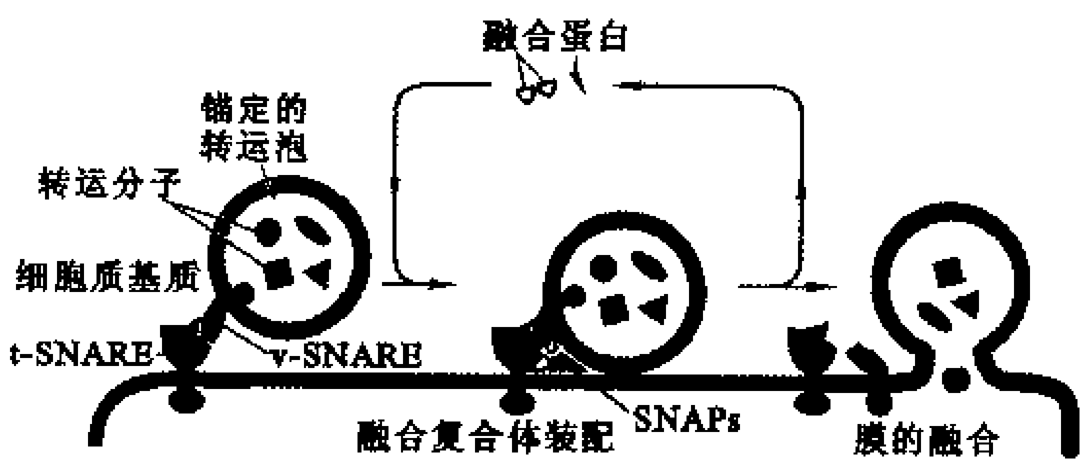


图 5-14 转运囊泡与靶膜的融合模型

某些病毒包膜蛋白在较低 pH 时,具有催化膜融合的功能。病毒通过受体介导的胞吞作用进入被其感染的细胞,被运送到胞内体,在胞内体酸性条件激活下,病毒包膜融合蛋白催化病毒与胞内体膜融合,使病毒核酸进入胞质并进行复制。人们已克隆出多种具有融合作用的病毒融合蛋白的基因,并进一步证明用这类基因转染的真核细胞表面存在表达的病毒包膜融合蛋白。当降低细胞培养液的 pH 时,被转染的细胞很快融合形成巨大的多核细胞。近来,哺乳动物细胞的融合蛋白也已被鉴定,与病毒融合蛋白相似,在受精过程中,被认为具有催化精子和卵细胞膜融合的作用。

第二节 细胞通讯与信号传递

多细胞生物是一个繁忙而有序的细胞社会，这种社会性的维持不仅依赖于细胞的物质代谢与能量代谢，还有赖于细胞通讯与信号传递，从而以不同的方式协调他们的行为，诸如细胞生长、分裂、死亡、分化及其各种生理功能。

一、细胞通讯与细胞识别

（一）细胞通讯

细胞通讯（cell communication）是指一个细胞发出的信息通过介质传递到另一个细胞产生相应的反应。细胞间的通讯对于多细胞生物体的发生和组织的构建，协调细胞的功能，控制细胞的生长和分裂是必需的。

细胞以三种方式进行通讯：① 细胞通过分泌化学信号进行细胞间相互通讯，这是多细胞生物包括动物和植物最普遍采用的通讯方式；② 细胞间接触性依赖的通讯（contact-dependent signaling），细胞间直接接触，通过与质膜结合的信号分子影响其他细胞；③ 细胞间形成间隙连接使细胞质相互沟通，通过交换小分子来实现代谢偶联或电偶联（见第四章有关间隙连接部分）。

细胞分泌化学信号的作用方式可分为：① 内分泌（endocrine），由内分泌细胞分泌信号分子（激素）到血液中，通过血液循环运送到体内各个部位，作用于靶细胞（图 5－15A）。② 旁分泌（paracrine）。细胞通过分泌局部化学介质到细胞外液中，经过局部扩散作用于邻近靶细胞（图 5－15B）。这对创伤或感染组织刺激细胞增殖以恢复功能具有重要意义。③ 自分泌（autocrine）。细胞对自身分泌的物质产生反应（图 5－15C）。自分泌信号常见于病理条件下，如肿瘤细胞合成和释放生长因子刺激自身，导致肿瘤细胞的增殖失控。④ 通过化学突触传递神经信号（neuronal signaling）（图 5－15D）。当神经元细胞在接受环境或其他神经细胞的刺激后，神经信号通过动作电位的形式沿轴突以高达 100 m/s 的速度传至末梢，刺激突触前突起终末分泌化学信号（神经递质或神经肽），快速扩散（不到千分之一秒）作用于相距 50 nm 的突触后细胞，影响突触后膜，实现电信号—化学信号—电信号转换和传导。此外，通过分泌外激素传递信息也属于通过化学信号进行细胞间通讯，作用于同类的其他个体。

细胞与细胞之间第二种通讯方式是细胞间接触性依赖的通讯，细胞间直接接触，它不需要分泌的化学信号分子的释放，代之以通过与质膜结合的信号分子与其相接触的靶细胞质膜上的受体分子相结合，影响其他细胞（图 5－15E）。这种通讯方式在胚胎发育过程中对组织内相邻细胞的分化具有重要作用。在胚胎发育过程中，神经系统来源于胚胎上皮细胞层。将发育为神经系统的上皮细胞层，最初相邻细胞之间是彼此相同的，在发育过程中，单个细胞通过独立分化成为神经元，而与其相邻的细胞则受到抑制保持非神经细胞状态。这是因为将分

化形成神经元的细胞通过膜结合的抑制信号分子(称为 Delta, δ)与其相接触的相邻细胞的膜受体结合,从而阻止它们也分化为神经元细胞。控制这一过程的信号是通过细胞间接触而传递的。这类信号分子与受体都是细胞的跨膜蛋白,在脊椎动物和无脊椎动物的各种其他组织中,控制细胞分化的过程,也是靠基本相同的分子所介导的相同的机制来实现的。在接触依赖性信号传递失败的突变体中,有些类型的细胞(如神经元)会过量发生。

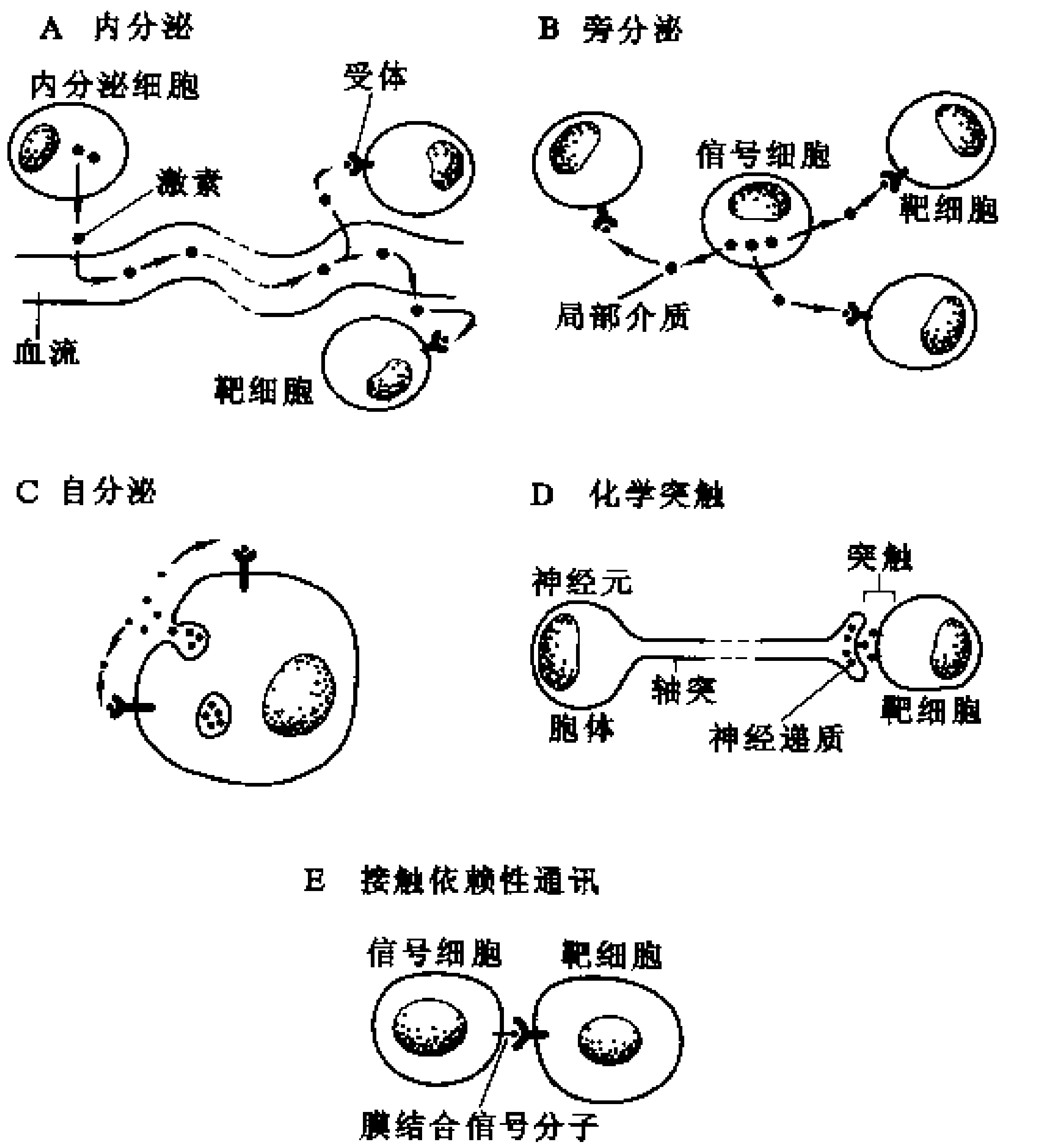


图 5-15 不同的细胞间通讯方式

A: 内分泌,由内分泌腺产生的激素,分泌进入血液循环,作用于相应的靶器官;B: 旁分泌,信号细胞分泌局部化学介质释放到细胞外液中,作用于邻近的靶细胞;C: 自分泌,细胞对其自身分泌的信号分子起反应;D: 化学突触,神经信号(神经递质或神经肽)通过突触传递影响靶细胞;E: 细胞间接触性依赖的通讯,细胞间接触性依赖的信号传递需要细胞膜与细胞膜之间彼此直接接触

(二) 细胞识别与信号通路

细胞识别(cell recognition)是指细胞通过其表面的受体与胞外信号物质分子(配体)选择性地相互作用,从而导致胞内一系列生理生化变化,最终表现为细胞整体的生物学效应的过程。可见细胞识别是细胞通讯的一个重要环节。细胞接受外界信号,通过一整套特定的机制,将胞外信号转导为胞内信号,最终调节特定基因的表达,引起细胞的应答反应,这是细胞信号系统的主线,这种反应系

列称之为细胞信号通路(signaling pathway)。细胞识别正是通过各种不同的信号通路实现的。

(三) 细胞的信号分子与受体

1. 细胞的信号分子

细胞的信号分子(signal molecule)根据其溶解性通常可分为亲脂性和亲水性两类:① 亲脂性信号分子,主要代表是甾类激素和甲状腺素,这类亲脂性分子小、疏水性强,可穿过细胞膜进入细胞,与细胞质或细胞核中受体结合形成激素－受体复合物,调节基因表达;② 亲水性信号分子,包括神经递质、生长因子、局部化学递质和大多数激素,它们不能穿过靶细胞质膜的脂双分子层,只能通过与靶细胞表面受体结合,再经信号转换机制,在细胞内产生第二信使或激活蛋白激酶或蛋白磷酸酶的活性,引起细胞的应答反应。此外,在 20 世纪 80 年代后期,发现和证实一氧化氮(nitric oxide, NO)在生物体内是一种重要的信号分子和效应分子,由于 NO 是迄今在体内发现的第一个气体性信号分子,它能进入细胞直接激活效应酶,参与体内众多的生理病理过程,因而成为人们所关注的"明星分子"(star molecule)。

表 5－3 列出了一些激素、局部介质、神经递质和接触依赖性信号分子。

表 5－3　一些信号分子举例

信号分子	合成或分泌位点	化学性质	生理功能
激素			
肾上腺素	肾上腺	酪氨酸的衍生物	增加血压、心律和代谢
皮质醇	肾上腺	类固醇(胆固醇衍生物)	影响多数组织中蛋白质、糖和脂质代谢
雌二醇	卵巢	类固醇(胆固醇衍生物)	诱导和维持雌性第二性征
胰高血糖素	胰腺 α 细胞	肽	刺激葡萄糖合成、糖原降解和脂肪分解(如肝细胞和脂肪细胞)
胰岛素	胰腺 β 细胞	蛋白质	刺激肝细胞葡萄糖摄取、蛋白质合成和脂质合成
睾丸酮	睾丸	类固醇(胆固醇衍生物)	诱导和维持雄性第二性征
甲状腺素	甲状腺	酪氨酸的衍生物	刺激多种类型细胞的代谢
局部介质			
表皮生长因子(EGF)	不同细胞	蛋白质	刺激上皮细胞和多种细胞的增殖
血小板衍生生长因子(PDEF)	不同细胞(包括血小板)	蛋白质	刺激多种类型细胞的增殖
神经生长因子(NGF)	各种神经支配的组织	蛋白质	促进某类神经元的存活;促进神经元轴突的生长
组胺	肥大细胞	组氨酸衍生物	扩张血管,增加渗透,有助发炎
一氧化氮(NO)	神经细胞 血管内皮细胞	可溶性气体	引起平滑肌细胞松弛;调节神经细胞活性
神经递质			
乙酰胆碱	神经终末	胆碱衍生物	在许多神经－肌肉突触和中枢神经系统中存在的兴奋性神经递质
γ-氨基丁酸(GABA)	神经终末	谷氨酸衍生物	中枢神经系统中存在的抑制性神经递质
接触依赖性信号分子			
Delta (δ)	预定神经元、其他各种胚胎细胞	跨膜蛋白	抑制相邻细胞以与信号细胞相同的方式分化

2. 受体

对多细胞生物而言,一个细胞经常暴露于环境中的以不同状态存在的上百种不同的信号分子,细胞对外界的这些特殊信号分子的反应能力取决于细胞是否具有相应的特殊受体。受体(receptor)是一种能够识别和选择性结合某种配体(信号分子)的大分子,当与配体结合后,通过信号转导(signal transduction)作用将胞外信号转换为胞内化学或物理的信号,以启动一系列过程,最终表现为生物学效应。受体多为糖蛋白,一般至少包括两个功能区域,与配体结合的区域及产生效应的区域,分别具有结合特异性和效应特异性。根据靶细胞上受体存在的部位,可将受体分为细胞内受体(intracellular receptor)和细胞表面受体(cell-surface receptor)(图 5 - 16)。前者受胞外亲脂性信号分子激活,后者受胞外亲水性信号分子激活。二者通过不同的机制介导不同的信号传递通路。

受体与信号分子空间结构的互补性是两者特异性结合的主要因素,但并不意味受体与配体之间是简单的一对一的关系。不同细胞对同一种化学信号分子可能具有不同的受体,因此,不同的靶细胞以不同的方式应答于相同的化学信号。例如同为乙酰胆碱作用于骨骼肌细胞引起收缩,作用于心肌细胞却降低收缩频率,作用于唾腺细胞则引起分泌。另外也有不同的细胞具有相同的受体,当与同一种信号分子结合时,不同细胞对同一信号产生不同的反应,或同一细胞上不同的受体应答于不同的胞外信号产生相同的效应。如肝细胞肾上腺素或胰高血糖素受体在结合各自配体被激活后,都能促进糖原降解而升高血糖;再有就是一种细胞具有一套多种类型的受体,应答多种不同的胞外信号从而启动细胞不同生物学效应,如存活、分裂、分化或死亡。由此可见,靶细胞一是通过受体对信号结合的特异性,二是通过细胞本身固有的特征对外界信号进行反应。

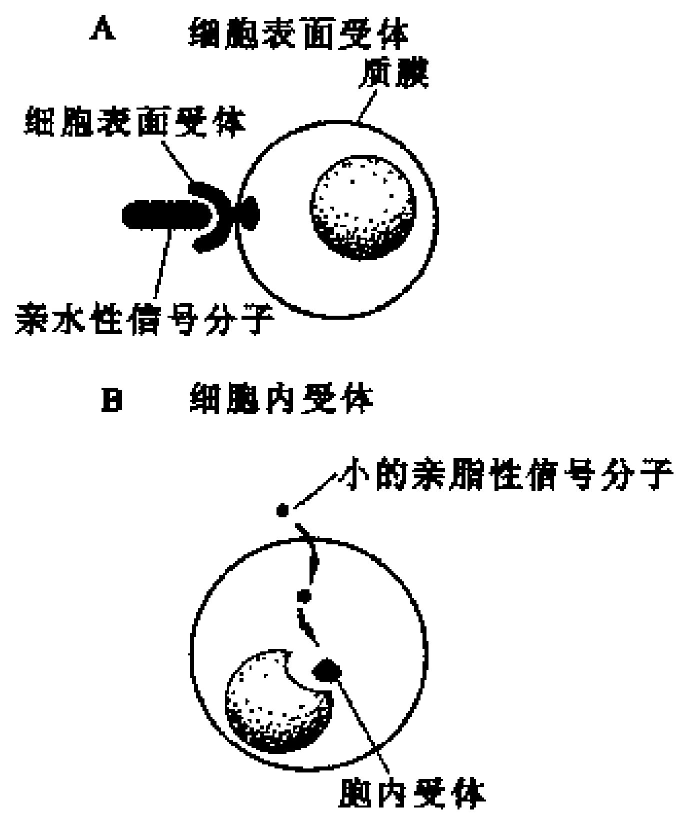


图 5 - 16　胞外信号分子或者与细胞表面受体结合或者与细胞内受体结合

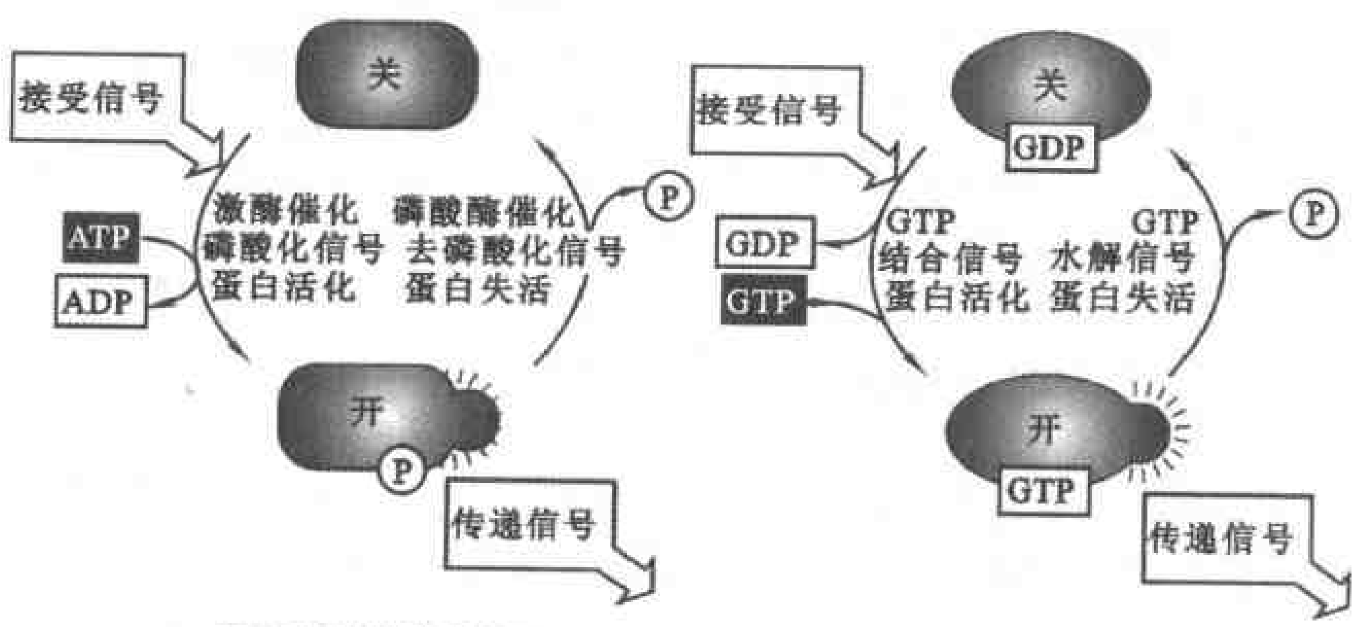
A: 绝大多数信号分子是亲水的,因此不能直接进入细胞膜,只能与细胞表面受体结合,通过信号转导产生一个或多个胞内信号;B: 有些小的亲脂性信号分子通过扩散直接透过细胞膜,与靶细胞内细胞质或细胞核内的受体结合

3. 第二信使与分子开关

人们很早就注意到,当动物受到惊吓时,立即分泌肾上腺素进入血液,作好反抗或逃跑的一系列准备,包括血压升高、心率和心输出量增加、肌糖原分解剧

增和肝糖原分解使血糖增加等等。20 世纪 50 年代，E.W.Sutherland 在体外实验证明，向肝组织切片加入肾上腺素时，可在悬浮液出现游离葡萄糖，而且明显导致糖原磷酸化酶活性的增加，此酶在糖原分解为葡萄糖过程中起限速作用。正是这项初步工作，导致了 cAMP 的发现。继而发现与糖原磷酸化酶活化和失活有关的酶，分别是磷酸化酶激酶和蛋白磷酸酶。因为肾上腺素可使糖原磷酸化，加速糖原分解，Sutherland 等开始试验能否将肾上腺素直接加入磷酸化酶激酶或蛋白磷酸酶纯制剂，而改变其活性，结果是否定的。但在破碎的肝细胞粗制剂中，肾上腺素与胰高血糖素却能促进磷酸化酶活化；同时表明，激素只有加入肝细胞匀浆的膜组分及细胞器时才有效。最后发现，在补充了 ATP 和 Mg^{2+} 的细胞匀浆的膜组分及细胞器部分后，促使生成了一种热稳定、可透析的小分子物质，并证实该物质是 cAMP。发现 cAMP 几年后，又进一步证实许多肽类激素都能影响靶细胞中 cAMP 的浓度，说明激素导致 cAMP 的生成具有普遍性。Sutherland 及其合作者在 70 年代初提出激素作用的第二信使学说(second messenger theory)：胞外化学物质(第一信使)不能进入细胞，它作用于细胞表面受体，而导致产生胞内第二信使，从而激发一系列生化反应，最后产生一定的生理效应，第二信使的降解使其信号作用终止。Sutherland 因为对 cAMP 的研究工作，阐明了它的功能并提出第二信使学说而获得 1971 年诺贝尔医学和生理学奖。他的研究结果一直作为基本模式指导着细胞信号系统的研究，并不断发展完善。现在一般将细胞外信号分子称为"第一信使"。第一信使与受体作用后在胞内最早产生的信号分子称为第二信使(second messenger)。目前公认的第二信使有 cAMP、cGMP、三磷酸肌醇(IP_3)、二酰基甘油(DG)等，Ca^{2+} 曾被当作第二信使，现在一般认为 Ca^{2+} 是磷脂酰肌醇信号通路的"第三信使"。

对于通过细胞表面受体所介导的信号通路而言，除受体本身作为离子通道而起效应器作用的情况之外，其他的信号通路首先要完成配体结合所诱发的信



A　通过磷酸化传递信号　　　B　通过结合蛋白传递信号

图 5－17　细胞内信号传导过程中两类分子开关蛋白

号跨膜转导，随之要通过细胞内信号分子(包括第二信使)完成信号的逐级放大和终止。在细胞内一系列信号传递的级联反应中，必须有正、负两种相辅相成的反馈机制进行精确控制，因此分子开关(molecular switches)的作用举足轻重，即对每一步反应既要求有激活机制又必然要求有相应的失活机制，而且两者对系统的功能同等重要。细胞内信号传递作为分子开关的蛋白质可分两类(图 5-17)：一类开关蛋白(switch protein)的活性由蛋白激酶使之磷酸化而开启，由蛋白磷酸酯酶使之去磷酸化而关闭(图 5-17A)，许多由可逆磷酸化控制的开关蛋白是蛋白激酶本身，在细胞内构成信号传递的磷酸化级联反应；另一类主要开关蛋白由 GTP 结合蛋白组成，结合 GTP 而活化，结合 GDP 而失活(图 5-17B)。

二、通过细胞内受体介导的信号传递

由于受体分子在细胞上存在部位的不同，因此其信息跨膜传递的方式也不同。亲脂性小分子通过与细胞内受体结合传递信号。细胞内受体的本质是激素激活的基因调控蛋白，构成细胞内受体超家族(intracellular receptor superfamily)。在细胞内，受体与抑制性蛋白(如 Hsp90)结合形成复合物，处于非活化状态。配体(如皮质醇)与受体结合，将导致抑制性蛋白从复合物上解离下来，从而受体通过暴露它的 DNA 结合位点而被激活。因此，这类受体一般都有三个结构域：位于 C 端的激素结合位点，位于中部富含 Cys、具有锌指结构的 DNA 或 Hsp90 结合位点，以及位于 N 端的转录激活结构域(图 5-18)。目前从克隆到的这类受体的 cDNA 分析发现，所含氨基酸残基数 400～900 不等，都具有高度保守的富含 Cys 的区域，由 70～80 个氨基酸残基组成两个锌指结构的重复单位。

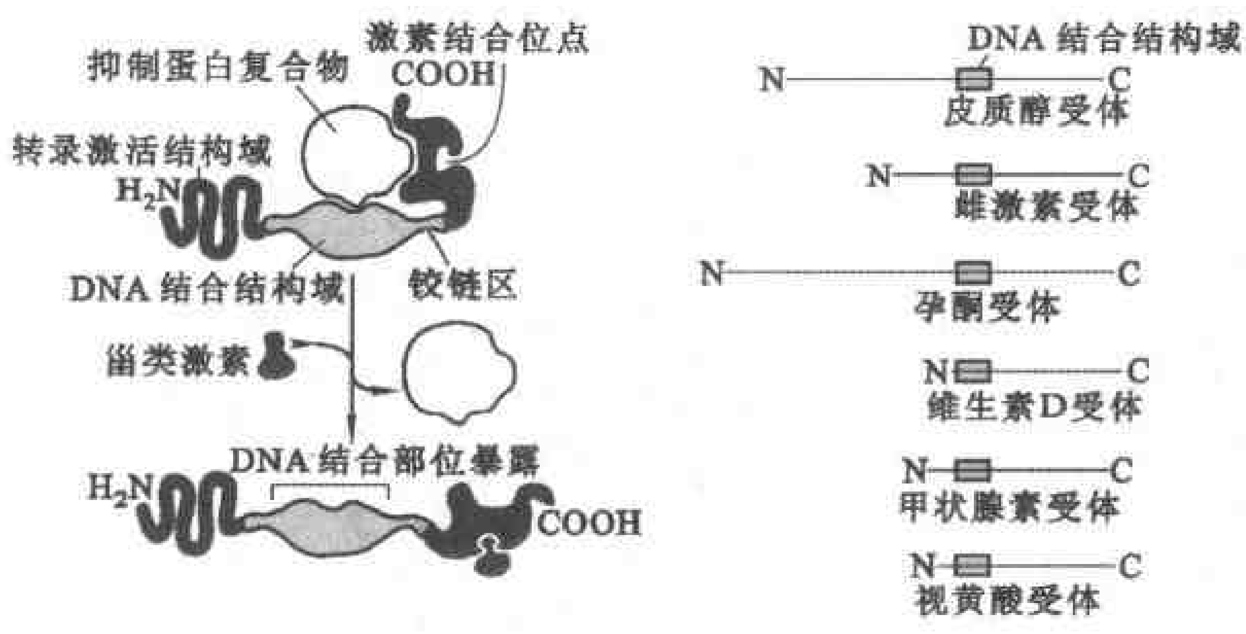


图 5-18 细胞内受体蛋白超家族

A：细胞内受体蛋白作用模型；B：几种胞内受体蛋白超家族成员

甾类激素分子是化学结构相似的亲脂性小分子，分子相对质量为 300 左右，可以通过简单扩散跨越质膜进入细胞内。每种类型的甾类激素与细胞质内各自的受体蛋白结合，形成激素－受体复合物，并能穿过核孔进入细胞核内，激素和受体的结合导致受体蛋白构象的改变，提高了受体与 DNA 的结合能力，激活的受体通过结合于特异的 DNA 序列调节基因表达。受体与 DNA 序列的结合已得到实验证实，结合序列是受体依赖的转录增强子，这种结合可增加某些相邻基因的转录水平。一般靶细胞中约有 $10^4 \sim 10^5$ 个甾类激素受体，已鉴定的几种甾类激素受体的一级结构相似，约 800 个氨基酸残基。甾类激素诱导的基因活化分为两个阶段：① 直接活化少数特殊基因转录的初级反应阶段，发生迅速；② 初级反应的基因产物再活化其他基因产生延迟的次级反应，对初级反应起放大作用。如果蝇注射蜕皮激素后仅 5～10 min 便可诱导唾腺染色体上 6 个部位的 RNA 转录，再过一段时间至少有 100 个部位合成 RNA，致使大量合成次级反应所特有的蛋白质产物。这类激素作用通常表现为影响如细胞分化等长期的生物学效应。甲状腺素和雌激素也是亲脂性小分子，其受体位于细胞核内，作用机理与甾类激素相同。也有个别的亲脂性小分子，如前列腺素，其受体在细胞膜上。

近年来 NO 作为信号分子的研究备受关注，R. Furchgott 等三位美国科学家因此获得 1998 年诺贝尔医学和生理学奖。NO 是一种自由基性质的气体，具脂溶性，可快速扩散透过细胞膜，到达邻近靶细胞发挥作用。由于体内存在氧及其他与 NO 发生反应的化合物（如超氧离子、血红蛋白等），因而 NO 在胞外极不稳定，其半衰期只有 5 s 左右，被氧化后以硝酸根（NO_3^-）或亚硝酸根（NO_2^{2-}）的形式存在于细胞内外液中。血管内皮细胞和神经细胞是 NO 的生成细胞，NO 的生成需要一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）的催化，以 L 精氨酸为底物，以还原型辅酶Ⅱ（NADPH）作为电子供体，等量地生成 NO 和 L 瓜氨酸。NO 没有专门的储存及释放调节机制，靶细胞上 NO 的多少直接与 NO 的合成有关。NO 这种可溶性气体，作为局部介质在许多组织中发挥作用，靶细胞内可溶性鸟苷酸环化酶（G－cyclase，GC）的激活是 NO 发挥作用的主要机制。内源性 NO

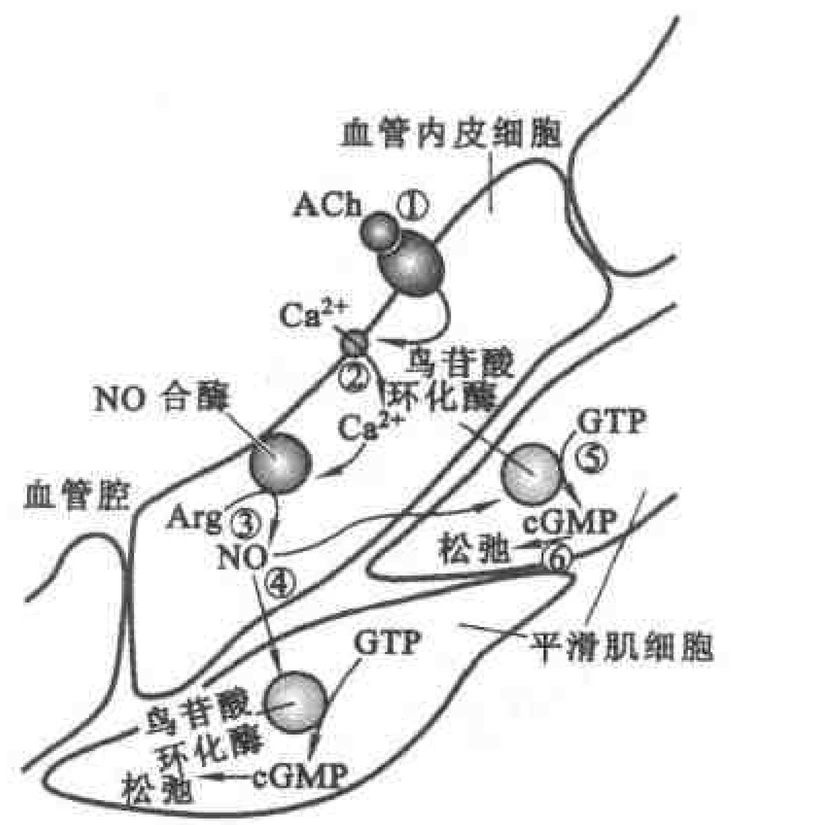


图 5－19　NO 在导致血管平滑肌舒张中的作用

血管神经终末释放乙酰胆碱作用于血管内皮细胞，被激活的血管内皮细胞产生并释放 NO，通过扩散进入邻近平滑肌细胞，导致血管平滑肌舒张

由 NOS 催化合成后，扩散到邻近细胞，与鸟苷酸环化酶活性中心的 Fe^{2+} 结合，改变酶的构象，导致酶活性的增强和 cGMP 合成增多。cGMP 作为新的信使分子介导蛋白质的磷酸化等过程，发挥多种生物学作用。

血管内皮细胞释放 NO，应答神经终末的刺激，NO 扩散进入靶细胞与靶蛋白结合，快速导致血管平滑肌的舒张，从而引起血管扩张、血流通畅（图 5-19）。

NO 对血管的影响可以解释为什么硝酸甘油能用于治疗心绞痛。硝酸甘油在体内转化为 NO，可舒张血管，从而减轻心脏负荷和心肌的需氧量。NO 也由许多神经细胞产生并传递信号，在参与大脑的学习记忆生理过程中具有重要作用。大脑海马某些区域在受到重复刺激后可产生一种持续增强的突触效应，称为长时程增强（long-term potentiation，LTP），是学习和记忆的分子基础。LTP 的产生涉及神经元间突触连接重构，这一过程既需要突触前神经元释放神经递质作用于突触后膜，也需要突触后神经元将信息反馈到突触前膜，NO 就充当了这一逆行信使的角色。NO 参与 LTP 的过程：兴奋性氨基酸 *N*-甲基-D-天冬氨酸（NMDA）受体活化引起突触后神经元 Ca^{2+} 内流，激活 NOS，使 NO 生成增多。NO 可作为 LTP 的逆行信使弥散至突触前终末，刺激谷氨酸递质不断释放，从而对 LTP 效应的维持起促进作用。此外，NO 在生理状态下，对脑血流的调节具有十分重要的作用，这与脑血管内皮细胞以及位于脑血管附近的脑实质神经元所含的 NOS 的生理性激活有关。在有些神经系统疾病的病理条件下，NO 具有双重作用。如脑缺血损伤，研究表明一旦脑缺血发生后即有短暂的通过 NOS 的激活而导致的 NO 增高，进而使脑血管扩张、增加脑血流、抗血小板凝集，从而对抗缺血性脑损伤而起保护作用。但如果病程发展到中、晚期，梗死灶内炎症细胞、吞噬细胞会诱导产生大量 NOS，由此造成的 NO 过度释放则引起神经毒作用。

三、通过细胞表面受体介导的信号跨膜传递

亲水性化学信号分子（包括神经递质、蛋白激素、生长因子等）一般不能直接进入细胞，而是通过与细胞表面特异受体的结合，进行信号转导继而对靶细胞产生效应。根据信号转导机制和受体蛋白类型的不同，细胞表面受体分属三大家族（图 5-20）：① 离子通道偶联的受体（ion-channel-linked receptor）；② G 蛋白偶联的受体（G protein-linked receptor）；③ 酶偶联的受体（enzyme-linked receptor）。其中第一类受体有组织分布特异性，主要存在于神经、肌肉等可兴奋细胞；后两种存在于不同组织的几乎所有类型的细胞。

（一）离子通道偶联的受体

离子通道偶联的受体是由多亚基组成的受体-离子通道复合体，本身既有信号结合位点，又是离子通道，其跨膜信号转导无需中间步骤。又称配体门离子通道（ligand-gated channel）或递质门离子通道（transmitter-gated channel）。主要存在于神经细胞或其他可兴奋细胞间的突触信号传递。神经递质通过与受体的

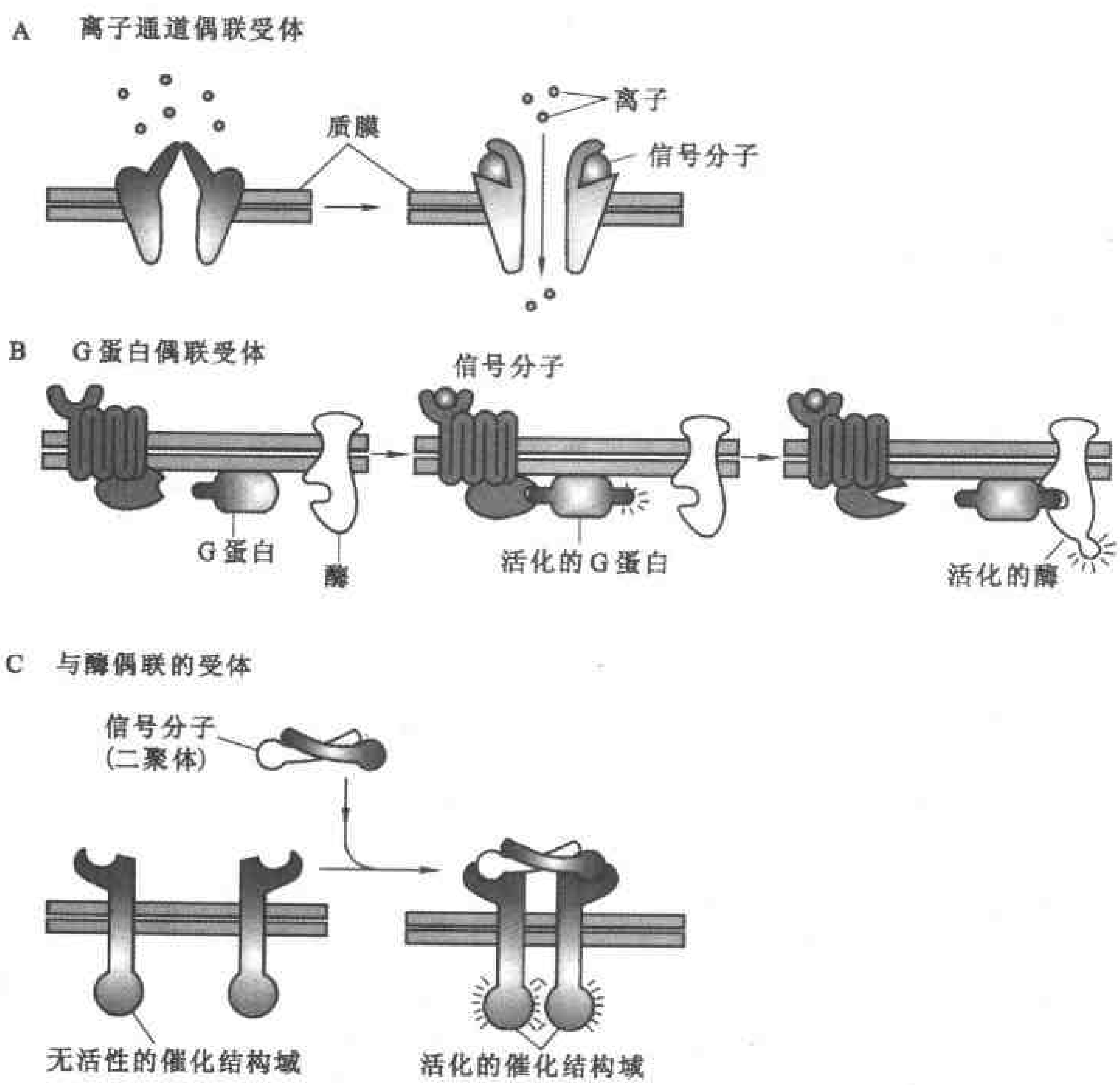


图 5－20　三种类型的细胞表面受体

结合而改变通道蛋白的构象，导致离子通道的开启或关闭，改变质膜的离子通透性，在千分之一秒内将胞外化学信号转换为电信号，继而改变突触后细胞的兴奋性（图 5－21）。离子通道偶联的受体既可分布在可兴奋细胞的细胞膜上，一般是 4 次跨膜蛋白；也可分布在内质网或其他细胞器的膜上，一般是 6 次跨膜蛋白。这类受体对配体具有特异性选择；激活的通道对运输的离子也有选择性，例如在肌细胞质膜上由乙酰胆碱激活的通道，选择性运输 Na^+ 和 Ca^{2+}，γ－氨基丁酸（GABA）激活的通道选择性运输 Cl^-，因此，这两种门通道分别命名为乙酰胆碱门 Na^+ 和 Ca^{2+} 通道，以及 γ－氨基丁酸门 Cl^- 通道。

（二）G 蛋白偶联的受体

G 蛋白偶联的受体，是指配体－受体复合物与靶蛋白（酶或离子通道）的作用要通过与 G 蛋白的偶联，在细胞内产生第二信使，从而将胞外信号跨膜传递到胞内影响细胞的行为。G 蛋白是三聚体 GTP 结合调节蛋白（trimeric GTP-binding regulatory protein）的简称，位于质膜内胞浆一侧，由 α、β、γ 三个亚基组成，$\beta\gamma$ 二聚体通过共价结合锚于膜上起稳定 α 亚基的作用，而 α 亚基本身具有

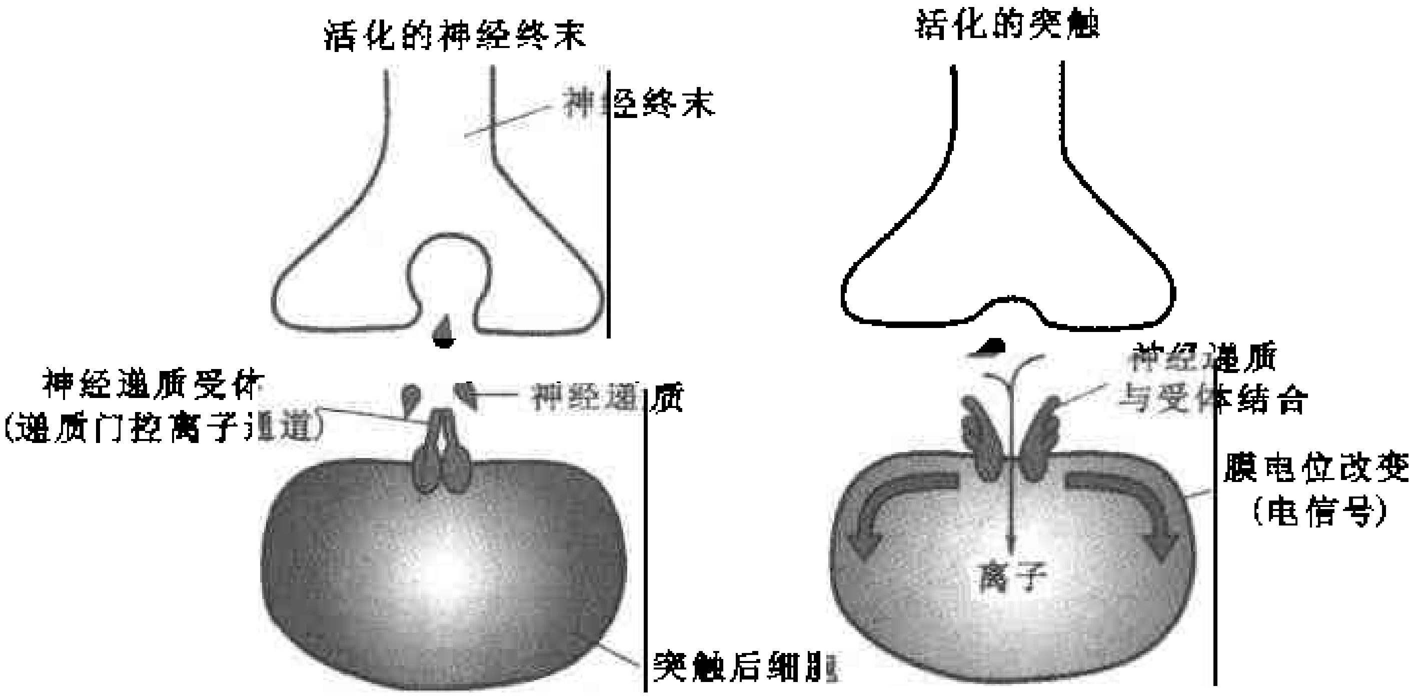


图5-21 在突触处通过递质门离子通道实现化学信号转换为电信号

突触前膜释放的神经递质结合并开启突触后细胞膜上的递质门离子通道,结果导致突触后细胞膜离子流改变,从而将化学信号转换成电信号

GTP 酶活性。G 蛋白在信号转导过程中起着分子开关的作用,当 G 蛋白 α 亚基与 GDP 结合,处于关闭态;当胞外配体与受体结合形成复合物时,导致受体胞内结构域与 G 蛋白 α 亚基偶联,并促使 α 亚基结合的 GDP 被 GTP 交换而被活化,即处于开启态,从而传递信号(图 5-22)。通过分子克隆方法现已分离鉴定了 21 种不同的 α 亚基,4 种 β 亚基,7 种 γ 亚基。

M.Rodbell 等在 20 世纪 80 年代初实验发现,在破损细胞中外源 GTP 对于激素激活或抑制腺苷酸环化酶是必需的,跨膜信号转导需要 GTP 存在。此后,A.G.Gilman 等人发现 G 蛋白缺失的突变细胞系尽管具有正常水平的受体和腺苷酸环化酶,但肾上腺素仍不能使腺苷酸环化酶激活。如果将这种不能偶联的细胞中的质膜制剂与用去垢剂从正常细胞中制备的 G 蛋白混合在一起,就可以重组需 GTP 的对激素敏感的腺苷酸环化酶体系。以后用纯化的肾上腺素受体、刺激型 G 蛋白和腺苷酸环化酶就可以在人工磷脂囊泡上重组有活性的肾上腺素激活的腺苷酸环化酶系统。这些实验结果阐明了胞外信号如何转换为胞内信号的机制,因此 1994 年医学和生理学诺贝尔奖授予了在 G 蛋白发现过程中作出重要贡献的 A.G.Gilman 和 M.Rodbell。

G 蛋白偶联的受体是细胞表面由单条多肽经 7 次跨膜形成的受体(图 5-23),N 端在细胞外,C 端在细胞内,受体的氨基酸序列含有 7 个疏水残基肽段,每段 22~24 个氨基酸残基,形成 7 次跨膜 α 螺旋,其中螺旋 5 和 6 之间的胞内环状结构域及 C 端肽段对与 G 蛋白的相互作用至关重要。G 蛋白偶联的受体介导无数胞外信号分子的细胞应答,包括多种蛋白或肽类激素、局部介质、神经递质和氨基酸或脂肪酸的衍生物以及光量子。尽管与这类受体相作用的信号分子多种多样、受体的氨基酸序列也千差万别,但从已分析过的与 G 蛋白偶联的受体的结果表明,在所有真核生物从单细胞酵母到多细胞哺乳类都具有相似的

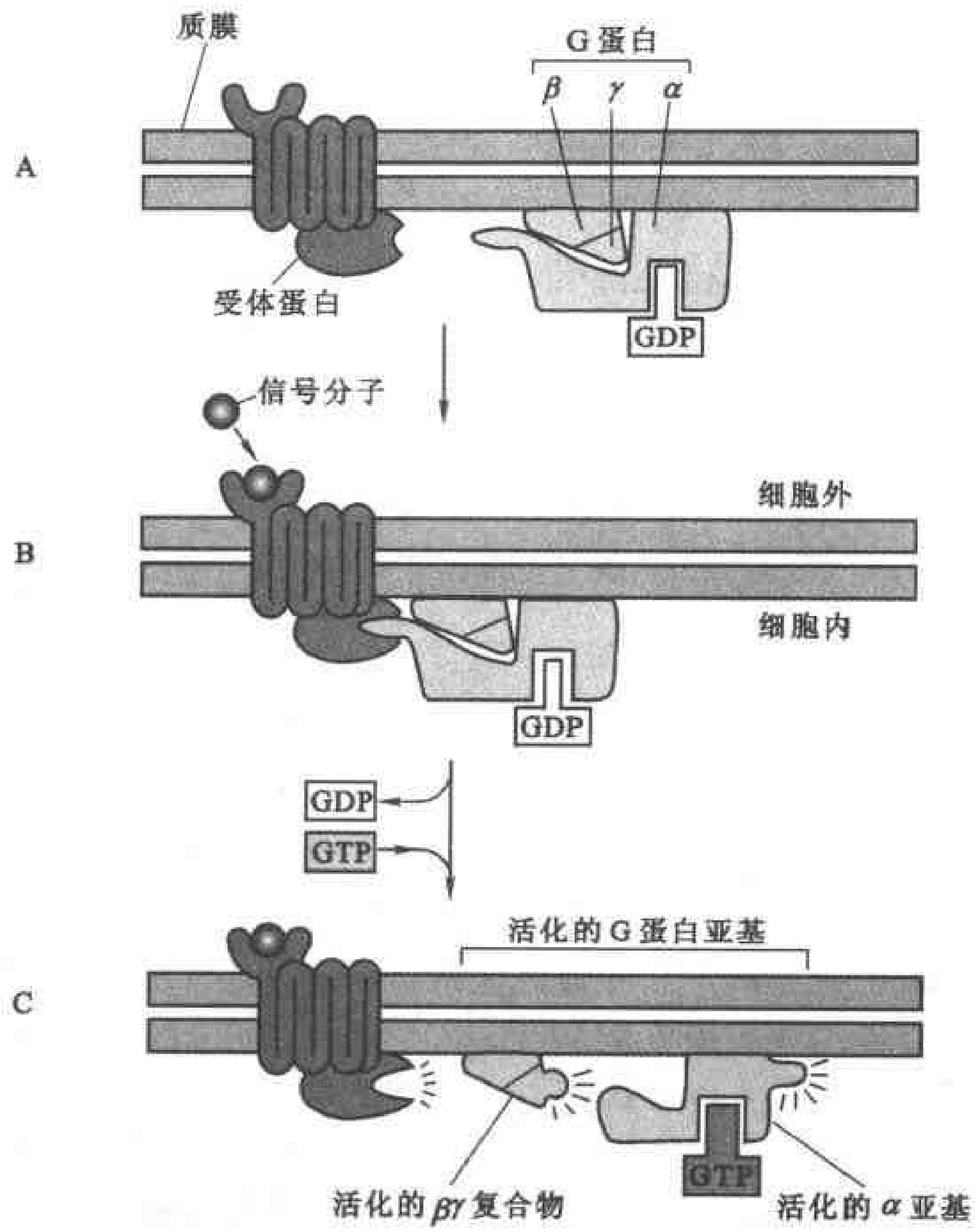


图 5－22　胞外信号结合所诱导的 G 蛋白的活化

7 次跨膜结构。甚至在细菌中虽然没有 G 蛋白，但发现具有结构相似的膜蛋白——视紫红质（一种光驱动的质子泵）。可见，这类受体在进化上是相当古老的。

由 G 蛋白偶联受体所介导的细胞信号通路主要包括：cAMP 信号通路和磷脂酰肌醇信号通路。

1．cAMP 信号通路

细胞外信号与相应受体结合，导致细胞内第二信使 cAMP 的水平变化而引起细胞反应的信号通路。这一信号通路的首要效应酶是腺苷酸环化酶（A-cyclase），通过腺苷酸环化酶调节胞内 cAMP 的水平。cAMP 可被磷酸二酯酶限制性地降解清除。这是真核细胞应答激素反应的主要机制之一。

cAMP 信号通路由质膜上的 5 种成分组成（图 5－24）：① 激活型激素受体（Rs）；② 抑制型激素受体（Ri）；③ 与 GDP 结合的活化型调节蛋白（Gs）；④ 与 GDP 结合的抑制型调节蛋白（Gi）；⑤ 催化成分，即腺苷酸环化酶（C）。

（1）Rs 和 Ri

Rs 是与 Gs 相互作用的激活型激素受体（如肾上腺素 β 受体）；Ri 是与 Gi 相

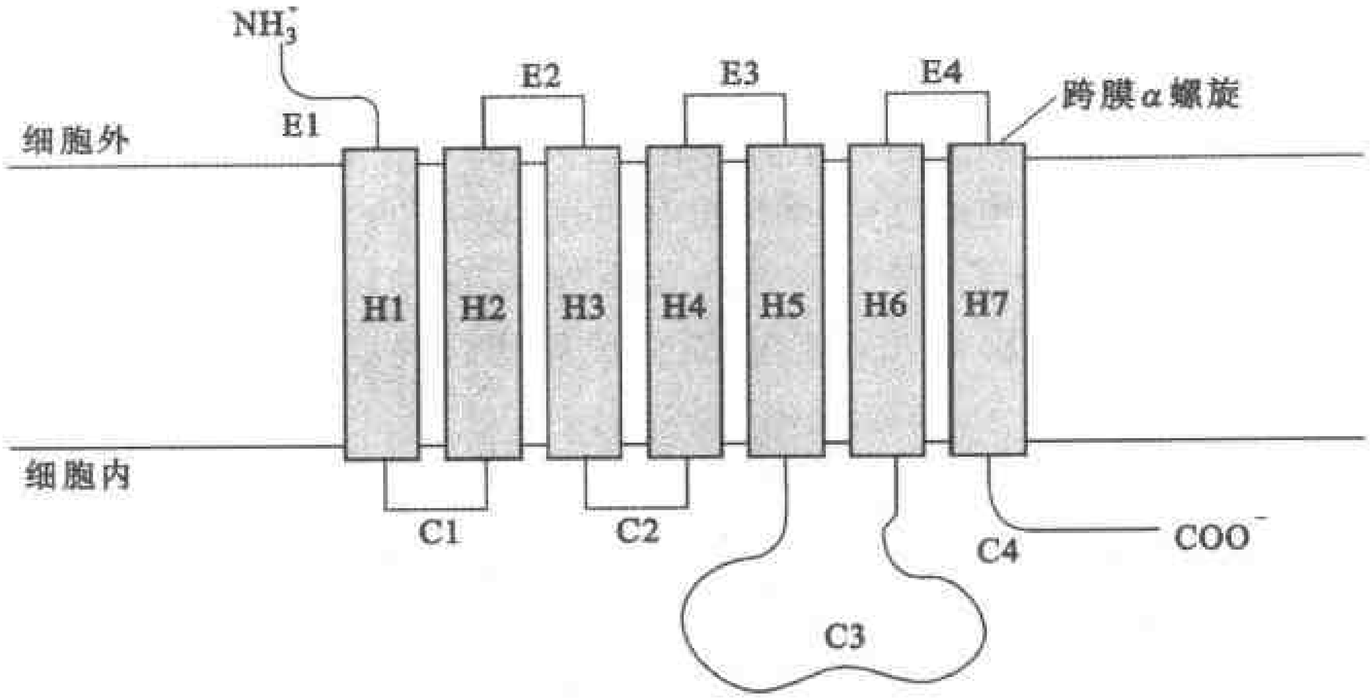


图 5-23 G 蛋白偶联的受体的模式图

E1～E4：细胞外环状结构域；H1～H7：跨膜 α 螺旋；C1～C4：胞质环状结构域

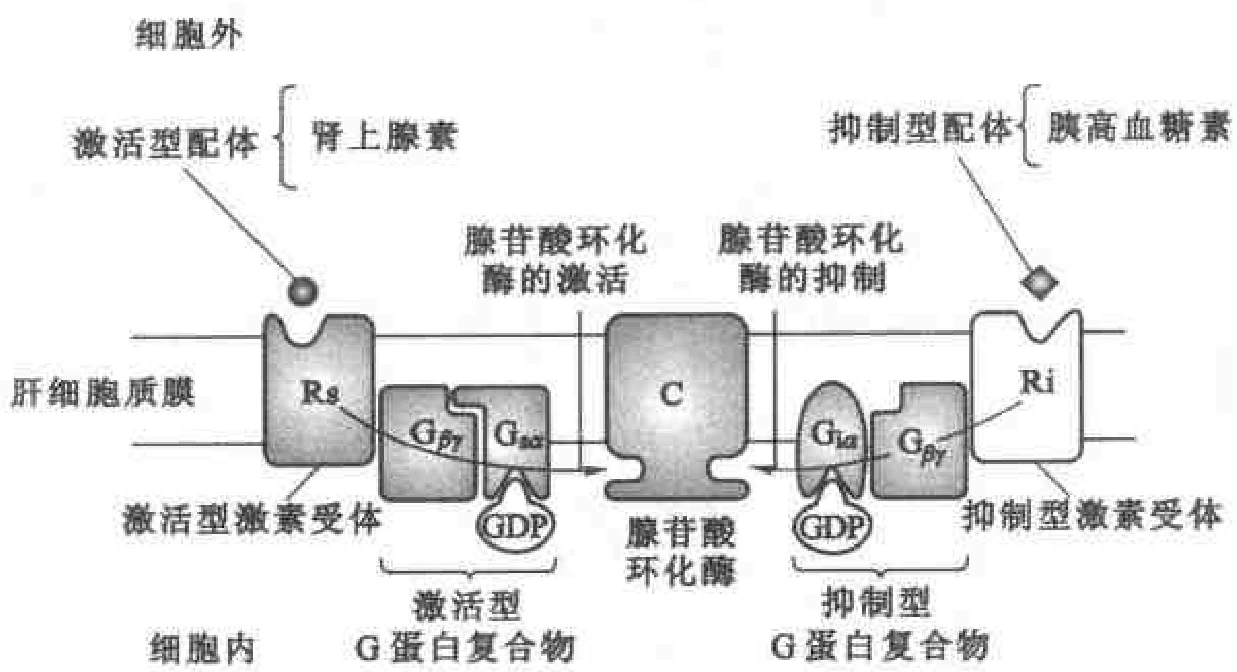


图 5-24 cAMP 信号通路的组成图解

激素所诱导的腺苷酸环化酶(C)的激活和抑制分别由 Gs 和 Gi 所介导

互作用的抑制型激素受体(如肾上腺素 α 受体)。两者具有相似的 7 次跨膜结构,但与之相应的胞外信号不同。受体胞外结构域识别胞外信号分子并与之结合,胞内结构域与 G 蛋白偶联。已鉴定有几十种 Rs,尽管彼此有所差异,但都能与 Gs 相互作用激活腺苷酸环化酶活性,提高胞内的 cAMP 水平。同样,也已鉴定有几十种彼此不同的 Ri,它们都能与 Gi 相互作用抑制腺苷酸环化酶活性,降低胞内的 cAMP 水平。

(2) Gs 和 Gi

G 蛋白在信号转导过程中起着分子开关的作用,亦称信号转换蛋白,它将受体与腺苷酸环化酶偶联起来,使细胞外信号跨膜转换为细胞内信号,即第二信使 cAMP。Gs 偶联 Rs 和腺苷酸环化酶,Gi 偶联 Ri 和腺苷酸环化酶。Gs 和 Gi 均已被纯化,相对分子质量为 $80\times10^3\sim100\times10^3$,均由 α、β、γ 亚基组成,其 β、γ

亚基相同,而 α 亚基各不相同。

Gs 的调节作用:当细胞没有受到激素刺激,Gs 处于非活化态时,Gs 蛋白为异三聚体,α 亚基与 GDP 结合,此时腺苷酸环化酶没有活性;当激素配体与 Rs 受体结合后,导致受体构象改变,暴露出与 Gs 结合的位点,膜的流动性使激素-受体复合物与 Gs 结合,Gs 的 α 亚基构象改变,从而排斥 GDP,结合 GTP 而活化,使三聚体Gs蛋白解离出α亚基和βγ亚基复合物,并暴露出α亚基与腺

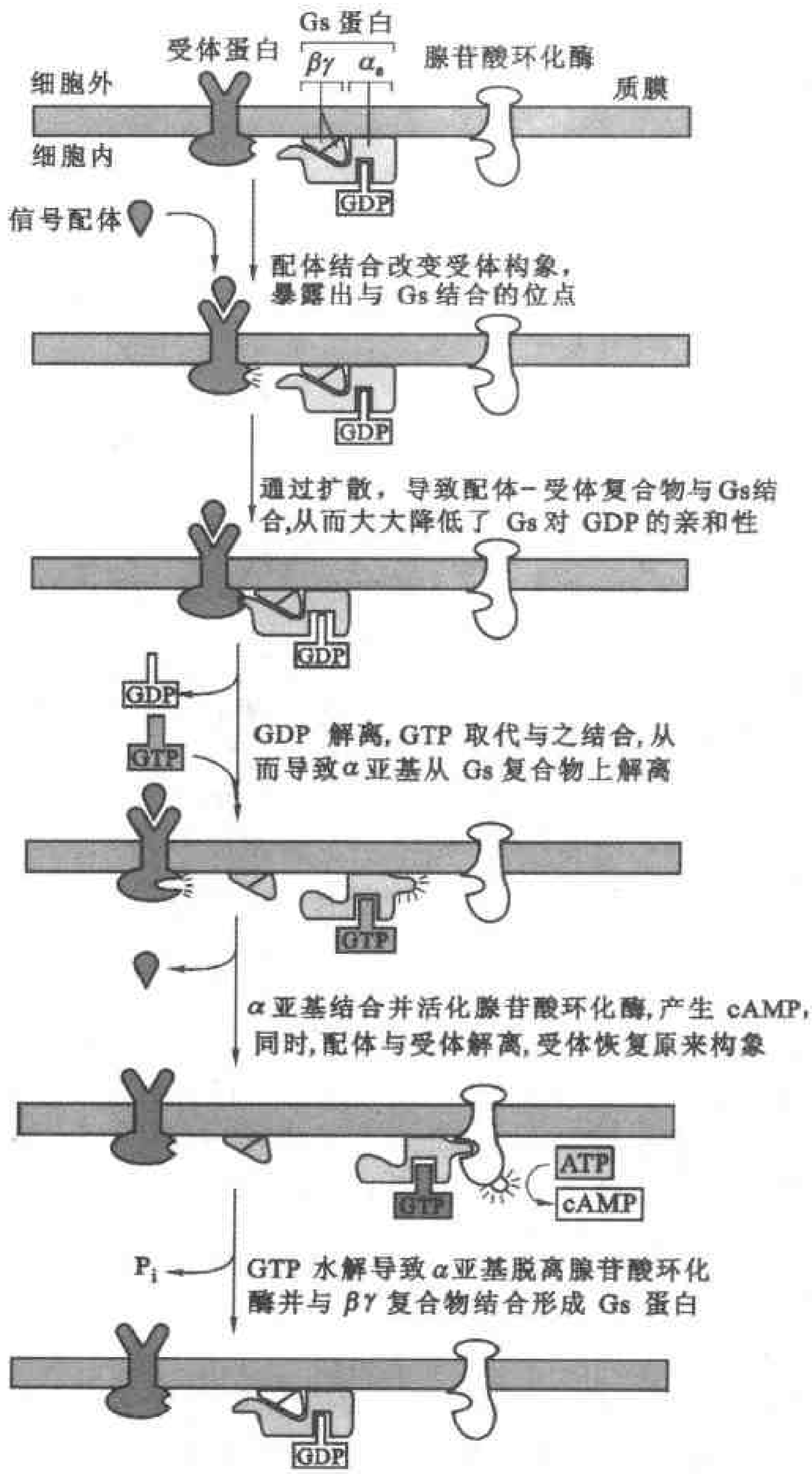


图 5-25　Gs 的调节作用:Gs 偶联受体激活腺苷酸环化酶的模型

苷酸环化酶的结合位点;结合 GTP 的 α 亚基与腺苷酸环化酶结合,使之活化,并将 ATP 转化为 cAMP。活化的 $\beta\gamma$ 亚基复合物也可直接激活胞内靶分子,具有传递信号的功能,如心肌细胞中 G 蛋白偶联受体在结合乙酰胆碱刺激下,活化的 $\beta\gamma$ 亚基复合物能开启质膜上的 K^+ 通道,改变心肌细胞的膜电位。此外 $\beta\gamma$ 亚基复合物也能与膜上的效应酶结合,对结合 GTP 的 α 亚基起协同或拮抗作用。随着 GTP 的水解使 α 亚基恢复原来的构象并导致与腺苷酸环化酶解离,终止腺苷酸环化酶的活化作用。α 亚基与 $\beta\gamma$ 亚基重新结合,使细胞回复到静止状态(图 5-25)。

Gi 的调节作用:Gi 对腺苷酸环化酶的抑制作用可通过两个途径:当 Gi 与 GTP 结合,Gi 的 α 亚基与 $\beta\gamma$ 亚基解离后,一是通过 α 亚基与腺苷酸环化酶结合,直接抑制酶的活性;二是通过 $\beta\gamma$ 亚基复合物与游离的 Gsα 亚基结合,阻断 Gs 的 α 亚基对腺苷酸环化酶的活化。

细菌毒素对 G 蛋白的修饰作用:某些细菌毒素为研究 cAMP 信号通路提供了重要的手段。霍乱毒素具有 ADP-核糖转移酶活性,进入细胞催化胞内的 NAD^+ 的 ADP 核糖基共价结合到 Gs 的 α 亚基上,致使 α 亚基丧失了 GTP 酶的活性,与 α 亚基结合的 GTP 不能水解成 GDP,结果 GTP 永久结合在 Gs 的 α 亚基上,使 α 亚基处于持续活化状态,因而腺苷酸环化酶不可逆地永久活化。霍乱病患者的症状是严重腹泻,其主要原因就是霍乱毒素催化 Gs 的 α 亚基 ADP-核糖基化,从而使腺苷酸环化酶被"锁定"在活化状态,致使小肠上皮细胞中 cAMP 增加 100 倍以上,导致膜蛋白让大量 Na^+ 和水持续外流,产生严重腹泻而脱水。

百日咳毒素催化 Gi 的 α 亚基 ADP-核糖基化,结果降低了 GTP 与 Gi 的 α 亚基结合的水平,使 Gi 的 α 亚基不能活化,从而阻断了 Ri 受体引起的对腺苷酸环化酶的抑制作用。

(3) 腺苷酸环化酶

cAMP 信号通路的催化单位是结合在质膜上的腺苷酸环化酶,它是一种相对分子质量为 1.5×10^5 的糖蛋白,跨膜 12 次。在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的存在下,腺苷酸环化酶催化 ATP 生成 cAMP(图 5-26)。作为胞内第二信使的 cAMP,在正常情况下细胞内 cAMP 的浓度 $\leqslant 10^{-6}$mol/L,当在激素激活腺苷酸环化酶后,cAMP 急剧增加,产生快速应答;在细胞内还有另一种酶即环腺苷酸磷酸二酯酶(PDE),可降解 cAMP 生成 5′-AMP,导致细胞内 cAMP 水平下降。cAMP 浓度在细胞内的迅速调节是细胞快速应答胞外信号改变的重要基础。作为一种普遍原则,在信号传递过程中,信号的放大作用和信号的终止作用同等重要,同时并存。

cAMP 信号通路的主要效应是激活靶酶和开启基因表达,这是通过蛋白激酶 A 完成的。cAMP 特异地活化 cAMP 依赖的蛋白激酶(A-kinase)而表现出不同的效应。蛋白激酶 A 由两个催化亚基和两个调节亚基组成,在没有 cAMP 时,以钝化复合体形式存在。cAMP 与调节亚基结合,改变调节亚基构象,使调

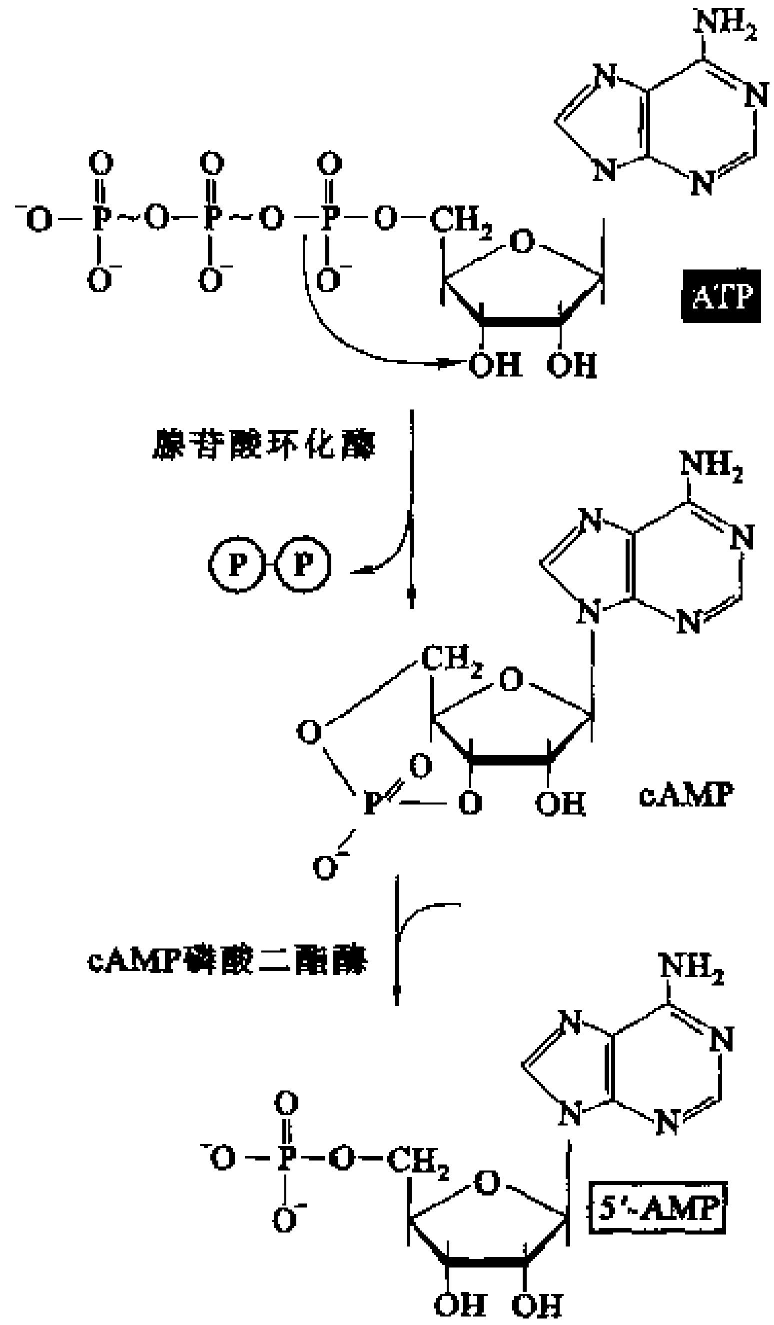


图 5－26　cAMP 的合成与降解

节亚基和催化亚基解离，释放出催化亚基（图 5－27）。活化的蛋白激酶 A 催化亚基可使细胞内某些蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化，于是改变这些蛋白的活性。在不同类型的细胞中有不同套的靶蛋白被磷酸化，例如同样是肾上腺素这种胞外信号的刺激，在骨骼肌细胞激活的蛋白激酶 A 使与糖原分解代谢有关的酶磷酸化，扳动分解糖原生成葡萄糖的机制；在脂肪组织使脂肪分解代谢有关的酶磷酸化，从而导致甘油三酯分解生成脂肪酸。这就解释了为什么 cAMP 的效应随靶细胞不同而变化。通过蛋白激酶 A 的活化，进而使下游靶蛋白磷酸化，从而影响细胞代谢和细胞行为是细胞快速应答胞外信号的过程。此外，还有一类细胞缓慢应答胞外信号的过程，这就是 cAMP 信号通路对细胞基因表达的影响。

第二信使 cAMP 影响细胞基因表达的效应是一个缓慢的过程。因为这一过程涉及细胞核机制，所以需要几分钟乃至几小时。这一信号通路控制多种细胞内的许多过程，从内分泌细胞的激素合成到脑细胞有关长期记忆所需蛋白质的产生。

该信号途径涉及的反应链（图 5－28）可表示为：激素→G 蛋白偶联受体→G 蛋白→腺苷酸环化酶→cAMP→cAMP 依赖的蛋白激酶 A→基因调控蛋白→基

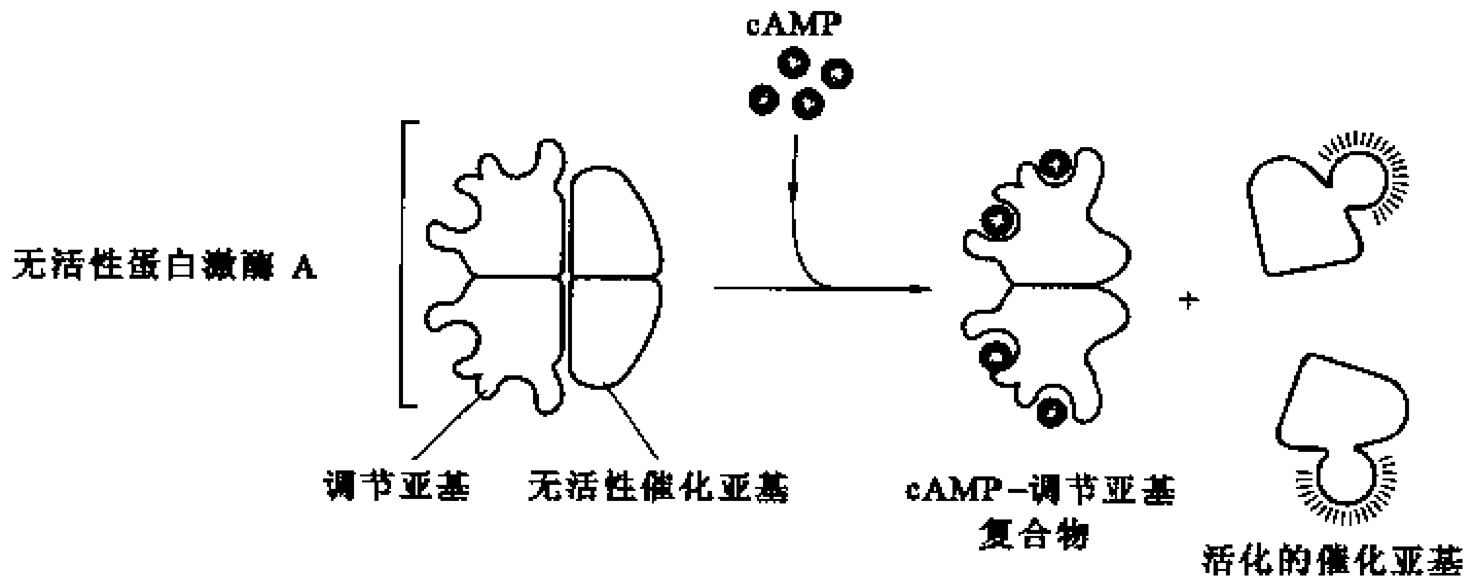


图 5-27　cAMP 特异地活化 cAMP 依赖的蛋白激酶 A

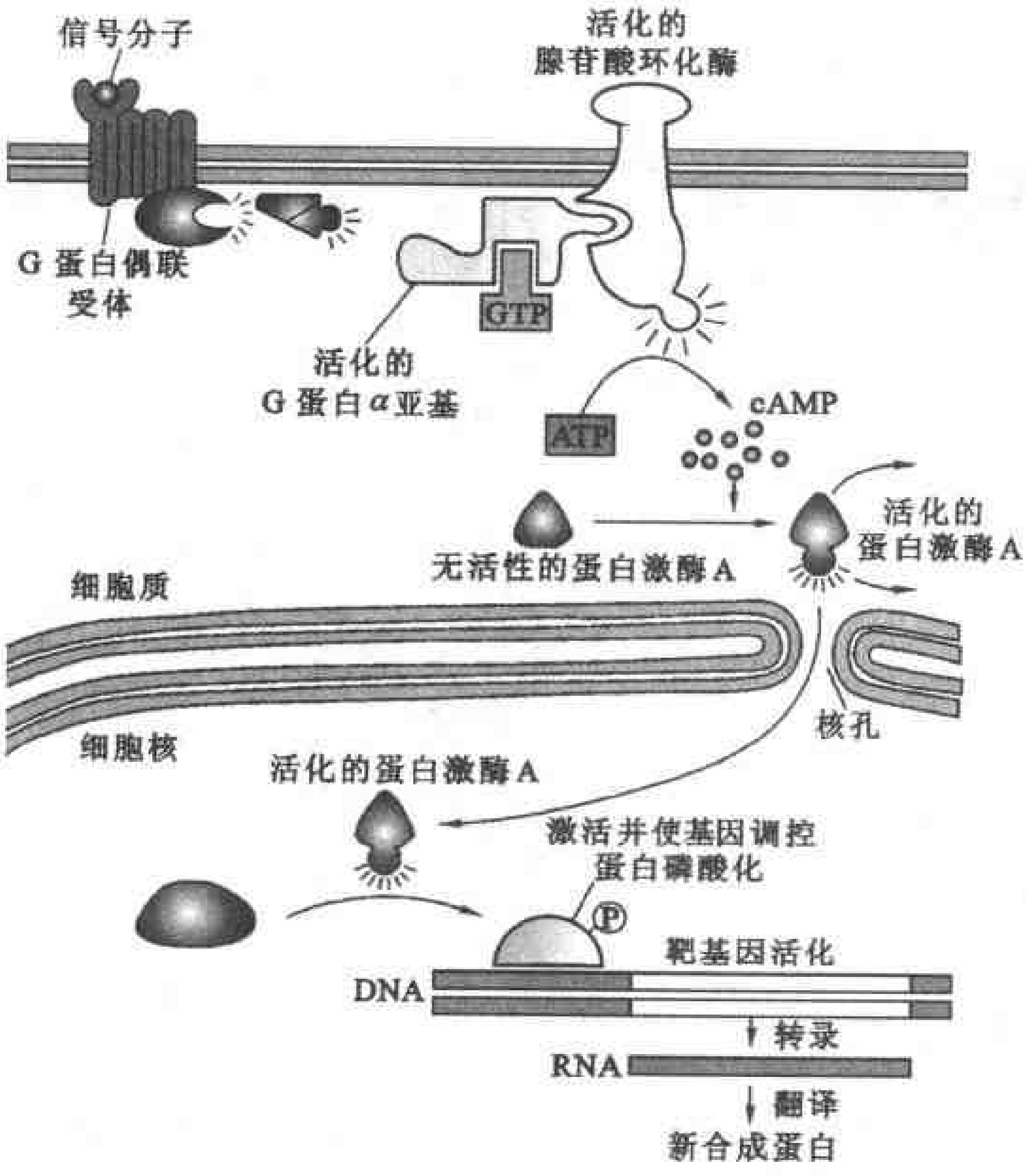


图 5-28　cAMP 信号通路对基因转录的激活

信号分子与受体结合通过 G 蛋白活化腺苷酸环化酶，导致细胞内 cAMP 浓度增高激活蛋白激酶 A，被活化的蛋白激酶 A（催化亚基）转位进入细胞核，使基因调控蛋白（cAMP 应答元件结合蛋白，CREB）磷酸化，磷酸化的基因调控蛋白与靶基因调控序列结合，增强靶基因的表达

因转录。

2．磷脂酰肌醇信号通路

通过 G 蛋白偶联的受体介导的另一条信号通路是磷脂酰肌醇信号通路。胞外信号分子与细胞表面 G 蛋白偶联受体结合，激活质膜上的磷脂酶 C(PLC)，使质膜上 4,5 - 二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)水解成 1,4,5 - 三磷酸肌醇(IP_3)和二酰基甘油(DG)两个第二信使，使胞外信号转换为胞内信号。IP_3 动员细胞内源钙到细胞溶质，使胞内 Ca^{2+} 浓度升高；DG 激活蛋白激酶 C(PKC)，活化的 PKC 进一步使底物蛋白磷酸化，并可活化 Na^+/H^+ 交换引起细胞内 pH 升高。以磷脂酰肌醇代谢为基础的信号通路的最大特点是胞外信号被膜受体接受后，同时产生两个胞内信使，分别激动两个信号传递途径即 IP_3-Ca^{2+} 和 DG - PKC 途径(图 5 - 29)，实现细胞对外界信号的应答，因此把这一信号系统又称之为"双信使系统"(double messenger system)。

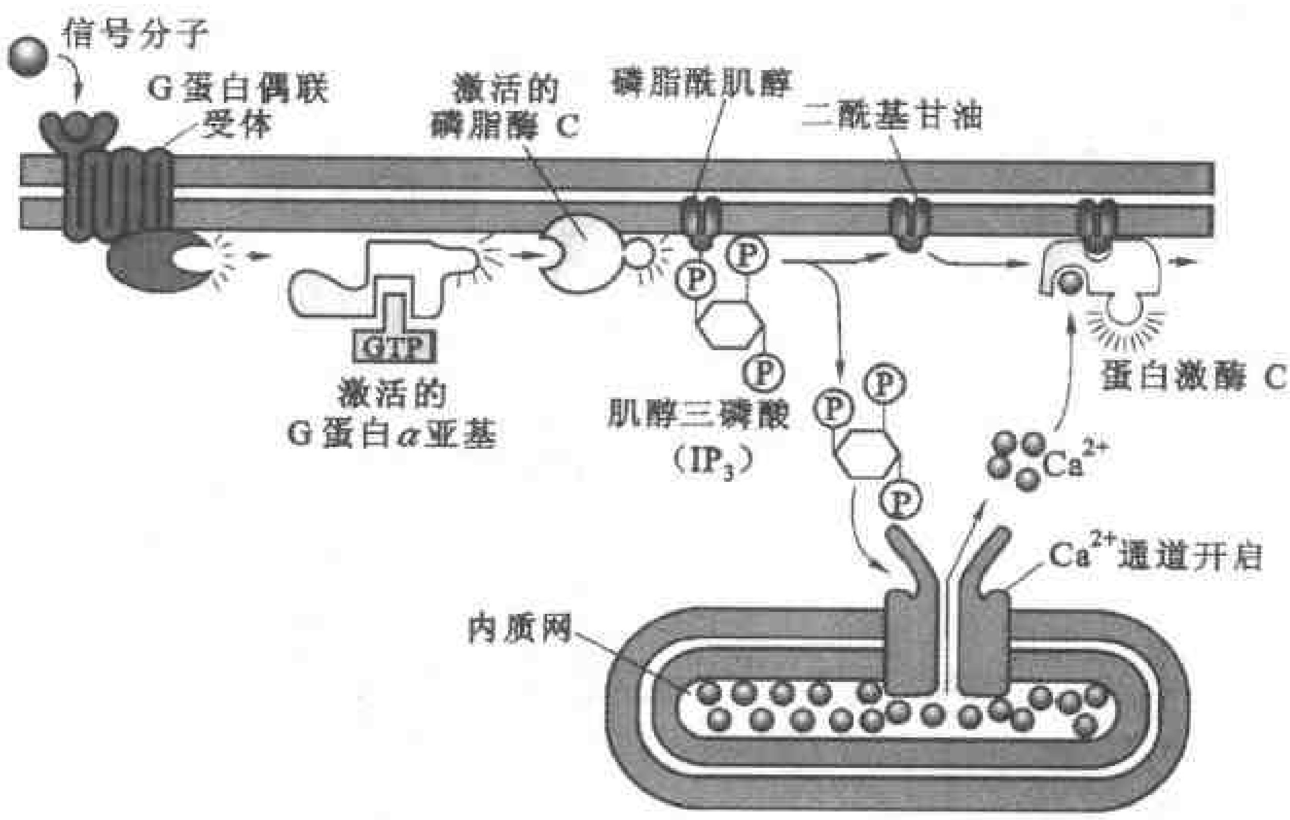


图 5 - 29　磷脂酰肌醇信号通路图解

胞外信号分子与 7 次跨膜受体结合活化 G 蛋白(Gq)，Gq 活化磷脂酶 C(PLC)，PLC 使 PIP_2 水解成 IP_3 和 DG 两个第二信使；IP_3 通过细胞溶质扩散，结合并打开内质网膜上 IP_3 敏感的 Ca^{2+} 通道，引起 Ca^{2+} 顺电化学梯度从钙库释放进入细胞溶质，通过钙调蛋白引起细胞反应；DG 和 Ca^{2+} 激活 PKC

细胞内存在磷脂酰肌醇循环途径(图 5 - 30)以保证磷脂酰肌醇信号通路的畅通。磷脂酰肌醇信号通路的关键反应是 PIP_2 水解生成 IP_3 和 DG 两个第二信使。PIP_2 是真核细胞质膜中普遍存在的一种化学成分，在 PIP_2 磷酸二酯酶(PLC)的作用下释放出 IP_3，同时生成 DG。通过 G 蛋白(Gq)偶联受体介导的磷脂酰肌醇信号通路的信号转导是通过效应酶磷脂酶 C 完成的。

IP_3 是一种水溶性分子，在细胞内动员内源 Ca^{2+}，主要是将储存在内质网中的 Ca^{2+} 转移到细胞质基质中，使胞质中游离 Ca^{2+} 浓度提高。这一作用发生在几乎所有真核细胞中。在双信使系统中，Ca^{2+} 的作用占有极其重要的位置，它不但可以作为胞内第三信使参与广泛的生理过程，活化各种 Ca^{2+} 结合蛋白引起

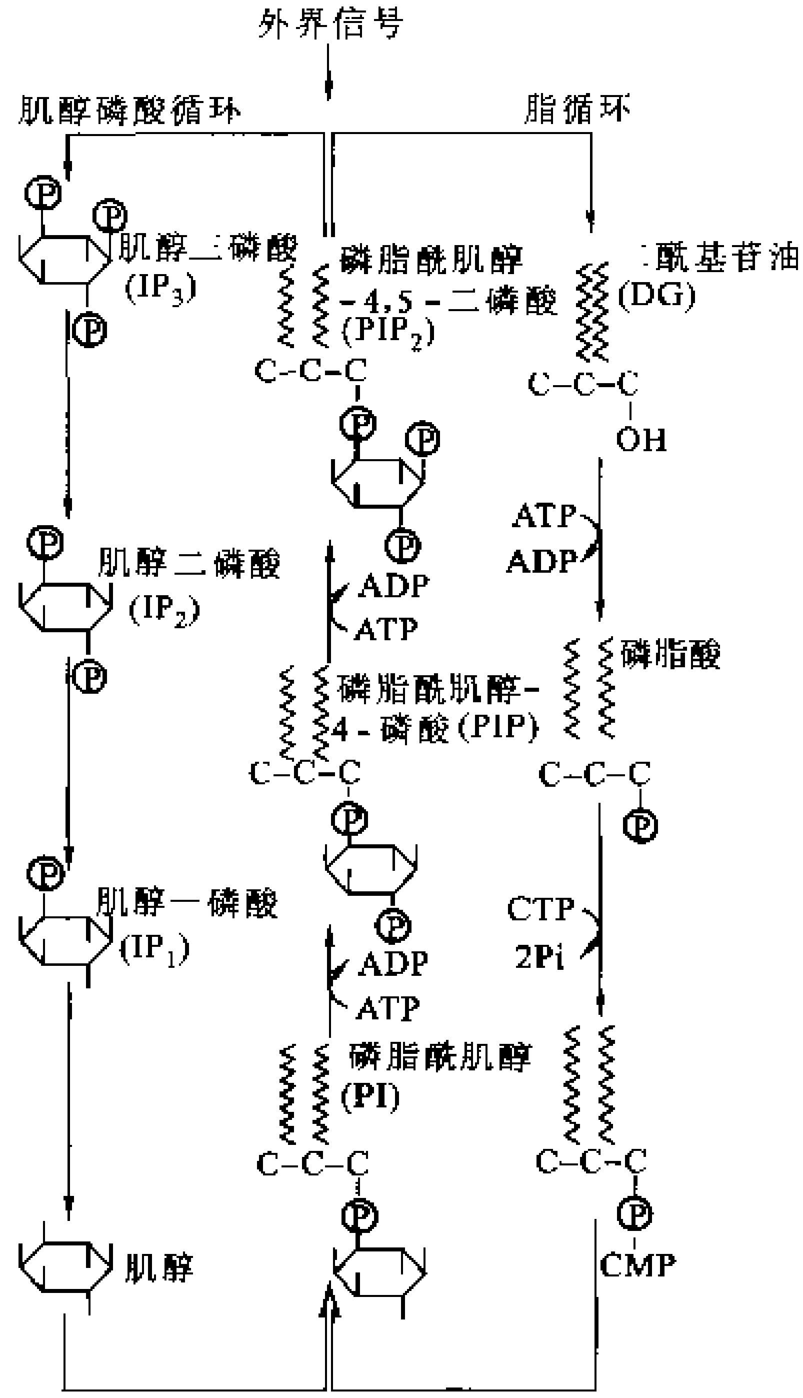


图 5-30　磷脂酰肌醇循环途径

细胞反应;而且在双信使系统本身功能的调节方面也非常重要。IP_3 信号的终止是通过依次的去磷酸化形成自由的肌醇(图 5-30)。在细胞质基质中,基态 Ca^{2+} 浓度约 10^{-7}mol/L,如果长时间维持细胞质基质中高浓度的 Ca^{2+} 会使细胞中毒,质膜上的 Ca^{2+} 泵和 $Na^{+}-Ca^{2+}$ 交换器(主要存在于可兴奋细胞)将 Ca^{2+} 抽出细胞,内质网膜上的钙泵会将高浓度的 Ca^{2+} 泵进内质网钙库。

钙调蛋白(calmodulin,CaM)是一种真核细胞普遍存在的 Ca^{2+} 应答蛋白,相对分子质量为 16.7×10^3,多肽链由 148 个氨基酸残基组成,含 4 个结构域,每个结构域可结合一个 Ca^{2+}。CaM 本身无活性,CaM 活化靶酶过程可分两步:首先 Ca^{2+} 与 CaM 结合形成活化态的 $Ca^{2+}-CaM$ 复合体,然后再与靶酶结合将其活化(表 5-4),这是一个受 Ca^{2+} 浓度控制的可逆反应。钙调蛋白激酶(CaM-kinase)是特别重要的一类靶酶,在哺乳类脑神经元突触处一种特殊类型的钙调蛋白激酶十分丰富,被认为是记忆路径形成的一部分,用于应答突触信号传递过程中所发生的细胞内 Ca^{2+} 脉冲。失去这种钙调蛋白激酶的突变小鼠表现出明显的记忆无能。

表 5-4　受钙调蛋白调节的酶

酶	细胞功能	酶	细胞功能
腺苷酸环化酶	合成 cAMP	磷酸化酶	糖原降解
鸟苷酸环化酶	合成 cGMP	肌球蛋白轻链激酶	平滑肌收缩运动
钙依赖性磷酸二酯酶	水解 cAMP 和 cGMP	钙调蛋白激酶	神经递质分泌和再合成，分子记忆
Ca^{2+}　ATP 酶	Ca^{2+}泵	钙依赖性蛋白磷酸酶	各种蛋白的去磷酸化
NAD 激酶	合成 NADP	转谷氨酰胺酶	蛋白质交联

DG 结合于质膜上，可活化与质膜结合的蛋白激酶 C。PKC 相对分子质量为 80×10^3，有两个功能区，一个是亲水的催化活性中心，另一个是疏水的膜结合区。在未受到刺激的细胞中，PKC 以非活性形式分布于细胞溶质中，当细胞接受外界信号时，PIP_2水解，质膜上DG瞬间积累，由于细胞溶质中Ca^{2+}浓度升

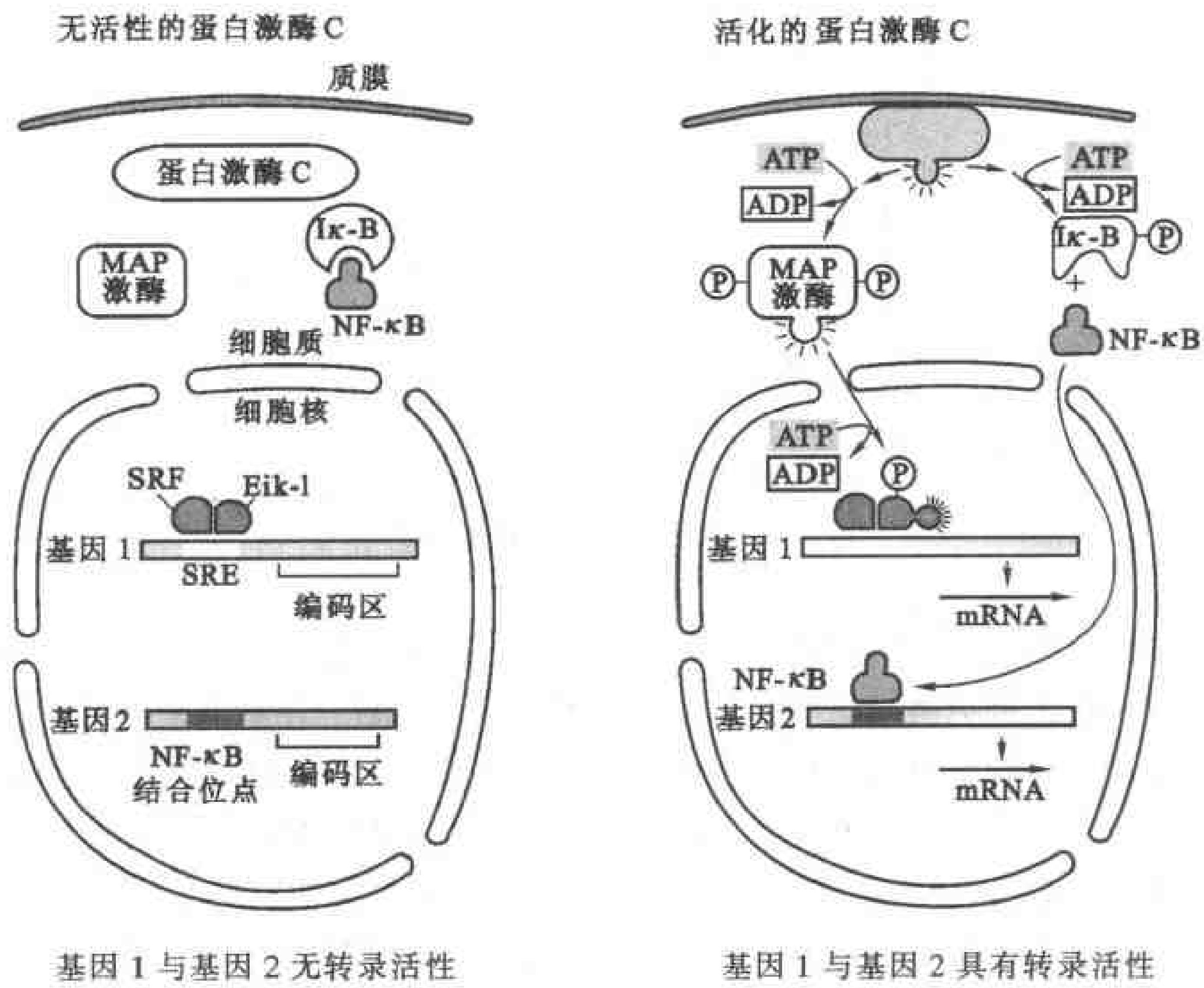


图 5-31　活化的 PKC 激活基因转录的两条细胞内途径

一条是 PKC 激活一系列磷酸化级联反应，导致 MAP 激酶的磷酸化并使之活化，MAP 激酶磷酸化并活化基因调控蛋白 Eik-1；Eik-1 与另一种 DNA 结合蛋白血清应答因子(SRF)共同结合在基因上短的 DNA 调控序列(血清应答元件,SRE)上；Eik-1 的磷酸化和活化，即可调节基因转录

另一条途径是 PKC 的活化导致 Iκ-B 磷酸化，使基因调控蛋白 NF-κB 与 Iκ-B 解离并进入细胞核，与相应的基因调控序列结合激活基因转录

高，导致细胞溶质中PKC转位到质膜内表面，被DG活化，进而使不同类型的细胞中的不同底物蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化。PKC是钙和磷脂酰丝氨酸依赖性酶，具有广泛的作用底物，参与众多生理过程，既涉及许多细胞“短期生理效应”如细胞分泌、肌肉收缩等，又涉及细胞增殖、分化等“长期生理效应”。DG只是PIP_2水解形成的暂时性产物，很快会被代谢掉。DG通过两种途径终止其信使作用：一是被DG激酶磷酸化成为磷脂酸，进入磷脂酰肌醇循环（图5－30）；二是被DG酯酶水解成单酯酰甘油。由于DG代谢周期很短，不可能长期维持PKC活性，而细胞增殖或分化行为的变化又要求PKC长期活性所产生的效应。现发现另一种DG生成途径，即由磷脂酶催化质膜上的磷脂酰胆碱断裂产生的DG，用来维持PKC的长期效应。

在许多细胞中，PKC的活化可增强特殊基因的转录。已知至少有两条途径：一是PKC激活一条蛋白激酶的级联反应，导致与DNA特异序列结合的基因调控蛋白的磷酸化和激活，进而增强特殊基因的转录；二是PKC的活化，导致一种抑制蛋白的磷酸化，从面使细胞质中基因调控蛋白摆脱抑制状态释放出来，进入细胞核，刺激特殊基因的转录（图5－31）。

（三）与酶连接的受体

通常与酶连接的细胞表面受体又称催化性受体（catalytic receptor），目前已知的这类受体都是跨膜蛋白，当胞外配基与受体结合即激活受体胞内段的酶活性。至少包括5类：① 受体酪氨酸激酶；② 受体丝氨酸/苏氨酸激酶；③ 受体酪氨酸磷酸酯酶；④ 受体鸟苷酸环化酶；⑤ 酪氨酸蛋白激酶联系的受体。

1. 受体酪氨酸激酶及RTK－Ras蛋白信号通路

受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinases，RTKs）又称酪氨酸蛋白激酶受体，是细胞表而一大类重要受体家族，包括6个亚族（图5－32）。它的胞外配体是可溶性或膜结合的多肽或蛋白类激素，包括胰岛素和多种生长因子。

当配体与受体结合，激活受体的酪氨酸蛋白激酶活性，随即引起一系列磷酸化级联反应，终致细胞生理和/或基因表达的改变。这条信号通路的特点是不需信号偶联蛋白（G蛋白），而是通过受体本身的酪氨酸蛋白激酶的激活来完成信号跨膜转导。受体酪氨酸激酶（RTKs）的多肽链只跨膜一次，胞外区是结合配体结构域，胞内区肽段是酪氨酸蛋白激酶的催化部位，并具有自磷酸化位点。配体（如EGF）在胞外与受体结合并引起构象变化，但单个跨膜α螺旋无法传递这种构象变化，因此配体的结合导致受体二聚化（dimerization）形成同源或异源二聚体，从而在二聚体内彼此相互磷酸化受体胞内肽段的酪氨酸残基，即实现受体的自磷酸化（autophosphorylation）。自磷酸化的结果是激活了受体的酪氨酸蛋白激酶活性，磷酸化的酪氨酸残基可被含有SH_2结构域的胞内信号蛋白所识别并与之结合，由此启动信号转导（图5－33）。现认为二聚化是一次跨膜的酶连受体被激活的普遍机制。

活化的RTK可以结合多种细胞溶质中带有SH_2结构域的结合蛋白或信号蛋白，其中一类是接头蛋白（adaptor proteins），如生长因子受体结合蛋白－2

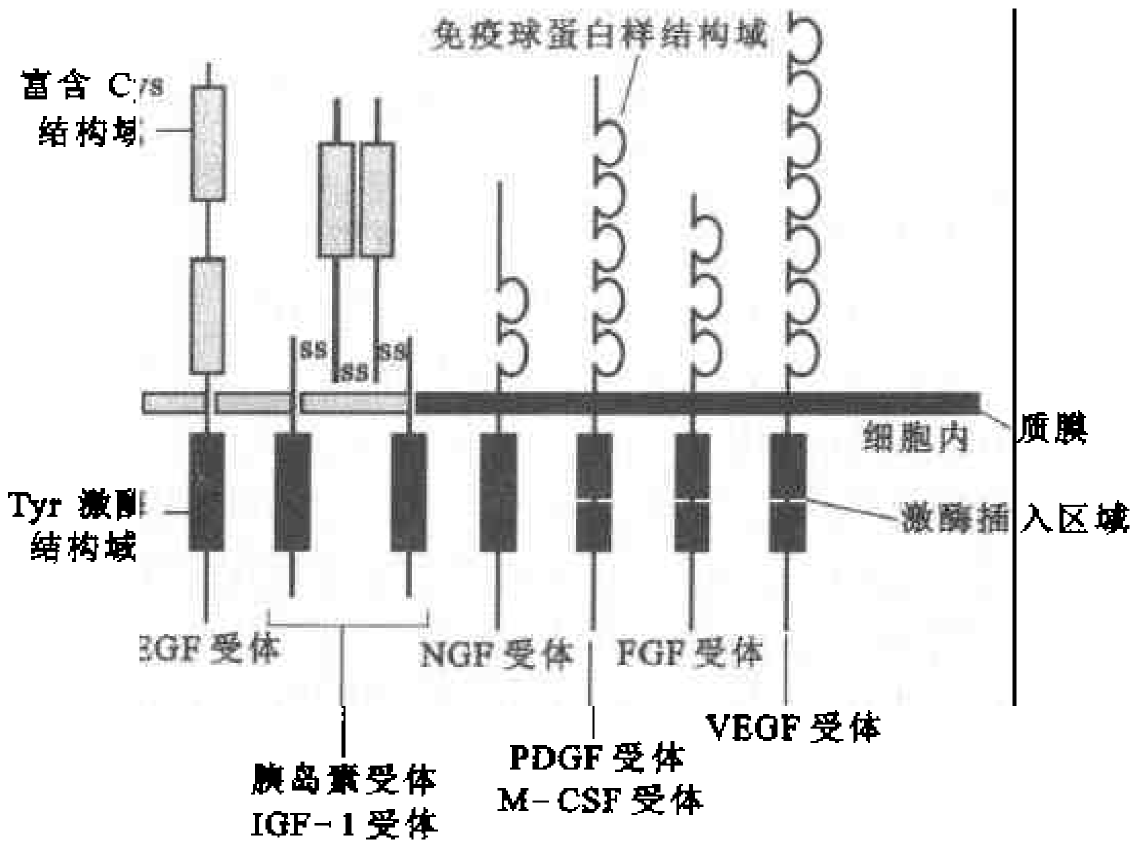


图 5-32　受体酪氨酸激酶(RTKs)的 6 个亚族

每个亚族只标示了 1~2 个成员;在一些亚族中酪氨酸蛋白激酶的结构域被激酶插入区所中断;关于富含半胱氨酸和类免疫球蛋白结构域的功能意义尚不清楚

EGF:表皮生长因子;IGF-1:胰岛素样生长因子-1;NGF:神经生长因子;PDGF:血小板衍生生长因子;M-CSF:巨噬细胞集落刺激因子;FGF:成纤维细胞生长因子;VEGF:血管内皮生长因子

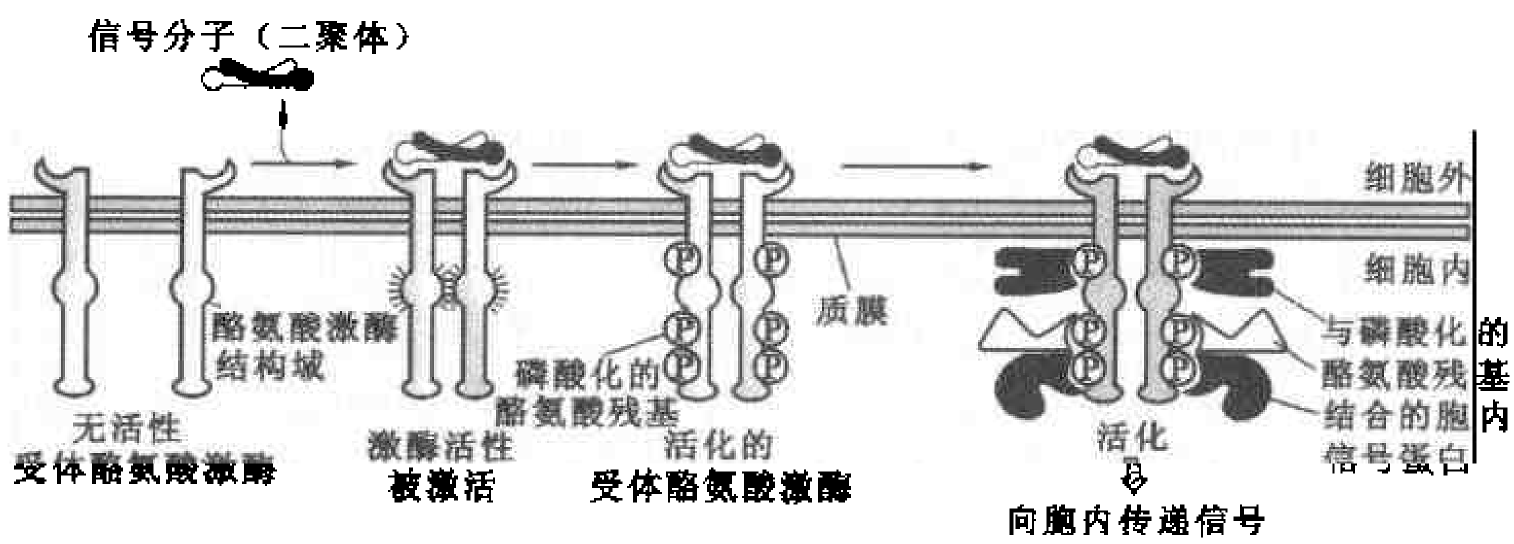


图 5-33　配基结合所诱导的受体酪氨酸激酶(RTKs)的二聚化与自磷酸化图解

(GRB-2),其作用是偶联活化受体与其他信号分子,参与构成信号转导复合物,但它本身不具酶活性,也没有传递信号的性质;另一类是在信号通路中有关的酶,如:GTP 酶活化蛋白(GTPase activating protein,GAP)、磷脂酰肌醇代谢有关的酶(磷脂酶 C-γ,3-磷脂酰肌醇激酶)、蛋白磷酸酯酶(SyP)以及 Src 类的非受体酪氨酸蛋白激酶等。这两类 RTK 结合蛋白的结构和功能不同,但它们都具有两个高度保守而无催化活性的结构域即 SH_2 和 SH_3。因为这两种结构域首先在 Src 蛋白中发现,所以称作 Src 同源区(Src homolog region2 和 3,SH_2 和 SH_3)。这两种结构域,SH_2 选择性结合不同位点的磷酸酪氨酸残基,SH_3 选择性结合不同的富含脯氨酸的序列。

正如G蛋白在7次跨膜受体介导的信号转导中所起的重要作用一样，在许多真核细胞中，Ras蛋白在RTK介导的信号通路中也是一种关键组分。Ras蛋白是*ras*基因表达产物。Ras是一种由190个氨基酸残基组成的小的GTP结合蛋白，具有GTPase活性，分布于质膜胞质一侧，结合GTP时为活化态，而结合GDP时为失活态。所以Ras蛋白具有分子开关的作用。Ras蛋白从失活态到活化态的转变，先要GDP释放才会有GTP的结合，GDP的释放需要鸟苷酸释放因子(GRF)参与；Ras蛋白从活化态到失活态的转变，则要GTP酶活化蛋白(GAP)的促进；所以GRF和GAP都与Ras蛋白参与的信号转导相关。GAP因具有SH_2结构域可直接与活化的受体结合。GRF有SH_3结构域，但没有SH_2结构域，因此不能直接和受体结合，而接头蛋白含SH_2和SH_3两类结构域，在配体激活受体后，接头蛋白通过SH_2与受体的磷酸酪氨酸残基结合，再通过SH_3与GRF结合，GRF与膜上的Ras接触，从而活化Ras(图5-34)。而Ras的失活则由活化受体上已结合的GAP参与下进行，即导致Ras蛋白结合的GTP水解成GDP。

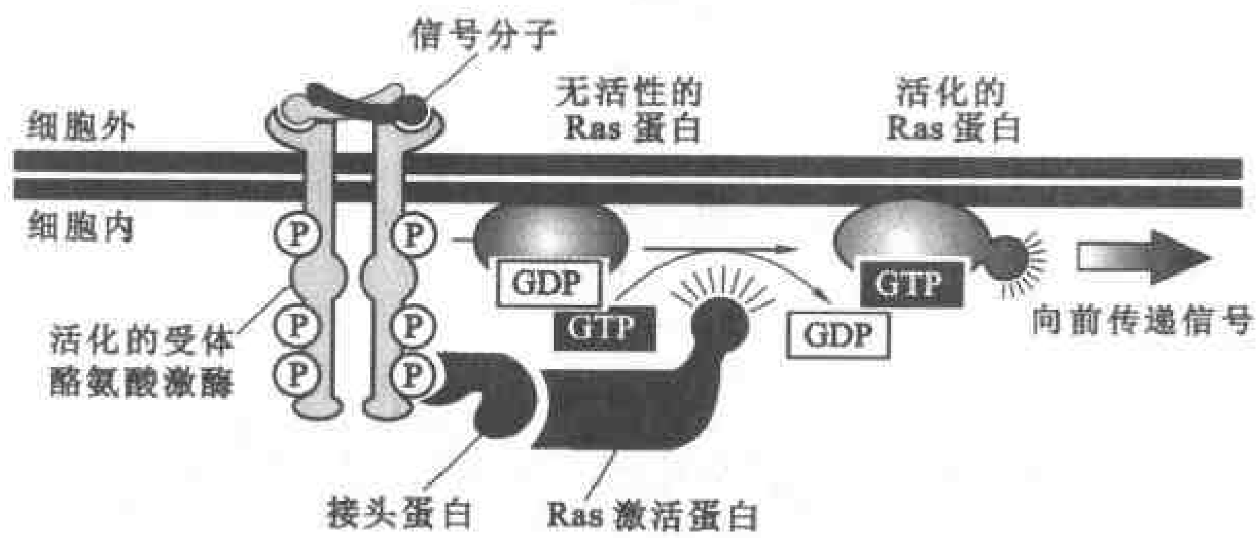


图5-34 活化的RTK激活Ras蛋白

接头蛋白连接活化的RTK与Ras激活蛋白(如GRF)，导致GDP-GTP交换，活化的Ras蛋白诱发信号通路的"下游事件"

Ras蛋白的活化及随后的细胞应答是通过配体与RTK的结合而诱导的，而Ras蛋白的活化对诱导不同类型细胞的分化或增殖又是必要而充分的。然而在有些突变细胞中组成型地活化Ras蛋白，即使在缺少配体结合的条件下，也会发生细胞的应答反应。已有大量研究表明，约30%的人类恶性肿瘤与*ras*基因突变有关，因为突变的Ras蛋白能够与GTP结合，但不能将其水解成GDP，所以这种突变的Ras蛋白被"锁定"在开启状态，结果引起赘生性细胞转化。

由RTK介导的信号通路具有广泛的功能，包括调节细胞的增殖与分化，促进细胞存活，以及细胞代谢过程中的调节与校正作用(adjustment)。各种不同的胞外配体(生长因子)与RTK结合，有时往往引起细胞内产生多向性的效应(pleiotropic effect)，包括早期和晚期基因表达。这种多向性效应是在配体作用下，产生多种信号转导的结果。通过对Ras及随后的一些信号蛋白的分子生物

学、生物化学研究和遗传分析，现在对 RTK - Ras 信号通路已有较多的了解。其中，通过高度保守的一系列激酶磷酸化级联反应（phosphorylation cascade）将 RTK 介导的信号从活化的 Ras 蛋白向下游传递，是这条通路的主线（图 5 - 35）。

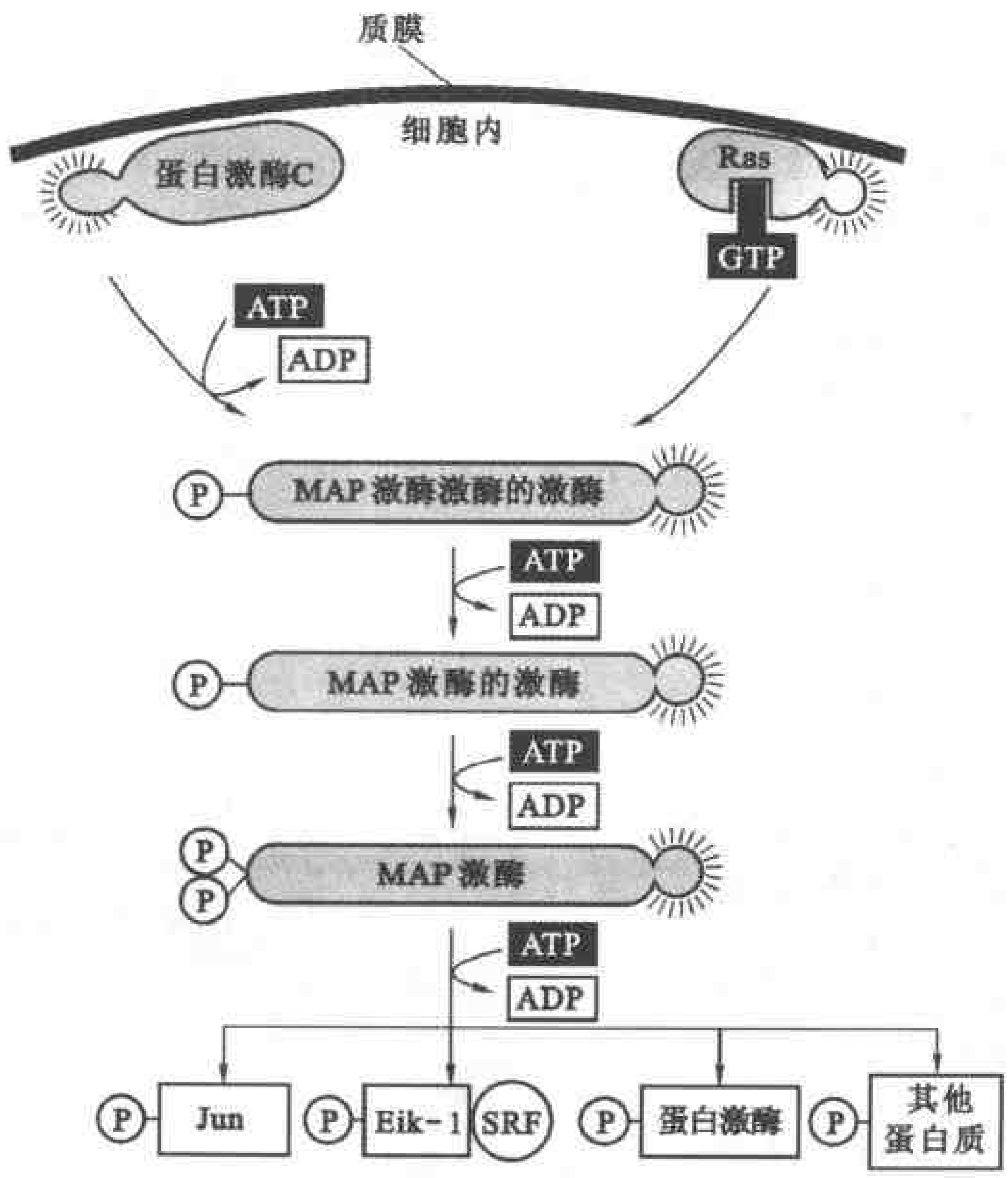


图 5 - 35　活化的 PKC 和 Ras 蛋白激活的激酶磷酸化级联反应

激活的 Ras 蛋白扳动三种蛋白激酶的磷酸化级联反应，增强和放大信号，级联反应的最后，才能磷酸化一些基因调控蛋白，改变基因表达模式；这是终致细胞行为（包括细胞增殖或分化，细胞存活或凋亡）改变的关键；通过 PKC 激活的靶酶可能是 Raf，也可能是其他丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

MAP：有丝分裂原活化蛋白；Raf = MAPKKK：MAP 激酶激酶的激酶；MAPKK = MEK：MAP 激酶的激酶；MAPK：有丝分裂原活化蛋白激酶；PKC：蛋白激酶 C

蛋白激酶的磷酸化级联反应的基本步骤如下：

（1）活化的 Ras 蛋白与 Raf 的 N 端结构域结合并使其激活，Raf 是丝氨酸/苏氨酸（Ser/Thr）蛋白激酶（又称 MAPKKK），它使蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化；丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化的蛋白其代谢周转比酪氨酸残基磷酸化的蛋白慢，这有利于使短寿命的 Ras - GTP 信号事件转变为长寿命的信号事件。

（2）活化的 Raf 结合并磷酸化另一种蛋白激酶 MAPKK，使其丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化导致 MAPKK 的活化。

（3）MAPKK 是一种双重特异的蛋白激酶，它能磷酸化其唯一底物 MAPK

的苏氨酸和酪氨酸残基使之激活。

(4) MAPK 在该信号通路的蛋白激酶磷酸化级联反应中是一种特别重要的组分，中文译名为有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase，MAPK)，活化的 MAPK 进入细胞核，可使许多底物蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化，包括调节细胞周期和细胞分化的特异性蛋白表达的转录因子，从而修饰它们的活性。

综上所述，RTK－Ras 信号通路可概括为如下模式：

配体→RTK→adaptor←GRF→Ras→Raf(MAPKKK)→MAPKK→MAPK→进入细胞核→其他激酶或基因调控蛋白(转录因子)的磷酸化修饰。

许多动物都有这个信号转导系统，但是不同物种甚至不同细胞的不同受体该途径所用的信号蛋白，即使功能相同，但成分并不相同。

2. 细胞表面其他与酶偶联的受体

(1) 受体丝氨酸/苏氨酸激酶

受体丝氨酸/苏氨酸激酶(receptor serine/threonine kinases)是一次性跨膜蛋白受体，在胞内区具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性，该受体以异二聚体行使功能。主要配体是转化生长因子－β_s(transforming growth factor－β_s，TGF－β_s)家族成员，包括 TGF－β_1～TGF－$\beta_5$5 种成员，具有类似结构与功能，对细胞具有多方面的效应，依细胞类型不同，可能抑制细胞增殖、刺激胞外基质合成、刺激骨的形成、通过趋化性吸引细胞和作为胚胎发育过程中诱导信号等。现对其信号传递途径知之不多。

(2) 受体酪氨酸磷酸酯酶

受体酪氨酸磷酸酯酶(receptor tyrosine phosphatases)是一次性跨膜蛋白受体，受体胞内区具有蛋白酪氨酸磷酸酯酶的活性，胞外配体与受体结合激发该酶活性，使特异的胞内信号蛋白的磷酸酪氨酸残基去磷酸化，因而在静止的细胞内维持被磷酸化的酪氨酸残基水平很低。它的作用似乎与 RTK 相反，不仅持续地逆转 RTK 的效应，在细胞信号系统中发挥特殊的调节作用，而且在细胞周期调控中发挥重要作用。存在于白细胞表面的抗原 CD45 被认为是这类受体，对具体配体的了解不多。

(3) 受体鸟苷酸环化酶

受体鸟苷酸环化酶(receptor guanylate cyclase)是一次性跨膜蛋白受体，胞外段是配体结合部位，胞内段为鸟苷酸环化酶催化结构域。受体的配体是心房肌肉细胞分泌的一组肽类激素心房排钠肽(atrial natriuretic peptides，ANPs)。当血压升高时，心房肌细胞分泌 ANPs，促进肾细胞排水、排钠，同时导致血管平滑肌细胞松弛，结果使血压下降。介导 ANP 反应的受体分布在肾和血管平滑肌细胞表面。ANPs 与受体结合直接激活胞内段鸟苷酸环化酶的活性，使 GTP 转化为 cGMP，cGMP 作为第二信使结合并激活 cGMP 依赖的蛋白激酶 G(PKG)，导致靶蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基活化。

除了与质膜结合的鸟苷酸环化酶外，在细胞质基质中还存在可溶性的鸟苷

酸环化酶，它们是 NO 作用的靶酶，催化产生 cGMP。

(4) 酪氨酸蛋白激酶联系的受体

酪氨酸蛋白激酶联系的受体(tyrosine kinase-linked receptors)本身不具有酶活性，但它的胞内段具有酪氨酸蛋白激酶的结合位点，也就是说它的活性依赖于非受体酪氨酸蛋白激酶(nonreceptor Tyr kinases)。这类受体是一大类异质性混合组分，包括造血系统中调节细胞增殖与分化的局部介质(细胞因子)的受体、某些激素如生长激素和催乳素的受体以及 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞抗原特异性受体。受体与配体结合后，通过与之相联系的酪氨酸蛋白激酶的活化，磷酸化各种靶蛋白的酪氨酸残基来实现信号转导。

已知与酪氨酸蛋白激酶相联系的受体有两大家族：一是与 Src 蛋白家族相联系的受体；二是与 Janus 激酶家族相联系的受体。这类受体的活化过程与 RTK 基本相同，同样涉及配体诱导的受体二聚化并形成功能受体复合物。不同之处是非受体酪氨酸蛋白激酶由另外的基因编码，并以非共价键与受体多肽结合。

在 Janus 激酶(Janus kinase，JAK)的直接底物中，近年来发现一类新的转录因子，称为信号转导子和转录激活子(signal transducer and activator of transcription，STAT)，STAT 具有 SH_2 和 SH_3 两类结构域，它可将细胞因子(cytokine)包括白细胞介素(IL)和干扰素(IFN)的信号，从受体联系的 JAKs 通过 STAT 的酪氨酸残基磷酸化等步骤，使活化的 STAT 以二聚体形式直接传到核内，调节特定基因的表达。这条信号通路称为 JAK－STAT 途径。

在哺乳类，非受体酪氨酸蛋白激酶 Src 家族至少有 8 种成员，它们都含有 SH_2 和 SH_3 两类结构域。不同的家族成员与不同的受体结合，并磷酸化不同套的靶蛋白。有时与 Src 蛋白家族相联系的受体和 RTK 激活某些相同的信号通路。

四、由细胞表面整联蛋白介导的信号传递

体外培养的正常细胞与癌变细胞一个显著的区别，前者不能在悬浮培养条件下生长、分裂，必须依赖于细胞表面和细胞外基质之间建立接触。整联蛋白(integrin)是细胞表面的跨膜蛋白，由 α 和 β 两个亚基组成的异二聚体，其胞外段具有多种胞外基质组分的结合位点，包括纤连蛋白、胶原和蛋白聚糖。因此，整联蛋白不仅介导细胞附着到胞外基质上，更重要的是提供了一种细胞外环境调控细胞内活性的渠道。整联蛋白的细胞外结构域与胞外配体(如纤连蛋白)相互作用，可产生多种信号，如 Ca^{2+} 释放进入细胞质基质，肌醇第二信使的合成，胞内蛋白酪氨酸残基的磷酸化等。这些信号对细胞具有深远影响，诸如细胞生长、迁移、分化乃至生存。正是这种原因，正常细胞不能悬浮生长，因为细胞丧失接受必要的生长促进信号。

细胞与胞外基质之间形成的粘着斑具有两方面的功能：一是机械结构功能，

粘着斑是相当复杂的大分子复合体，粘着斑的装配也是受信号控制的装配，通过肌动蛋白纤维和多种肌动蛋白的结合蛋白而完成；二是信号传递功能，通过酪氨酸激酶 Src 和粘着斑激酶(focal adhesion kinase，FAK)而实现。导致粘着斑装配的信号通路有两条(图 5－36)。

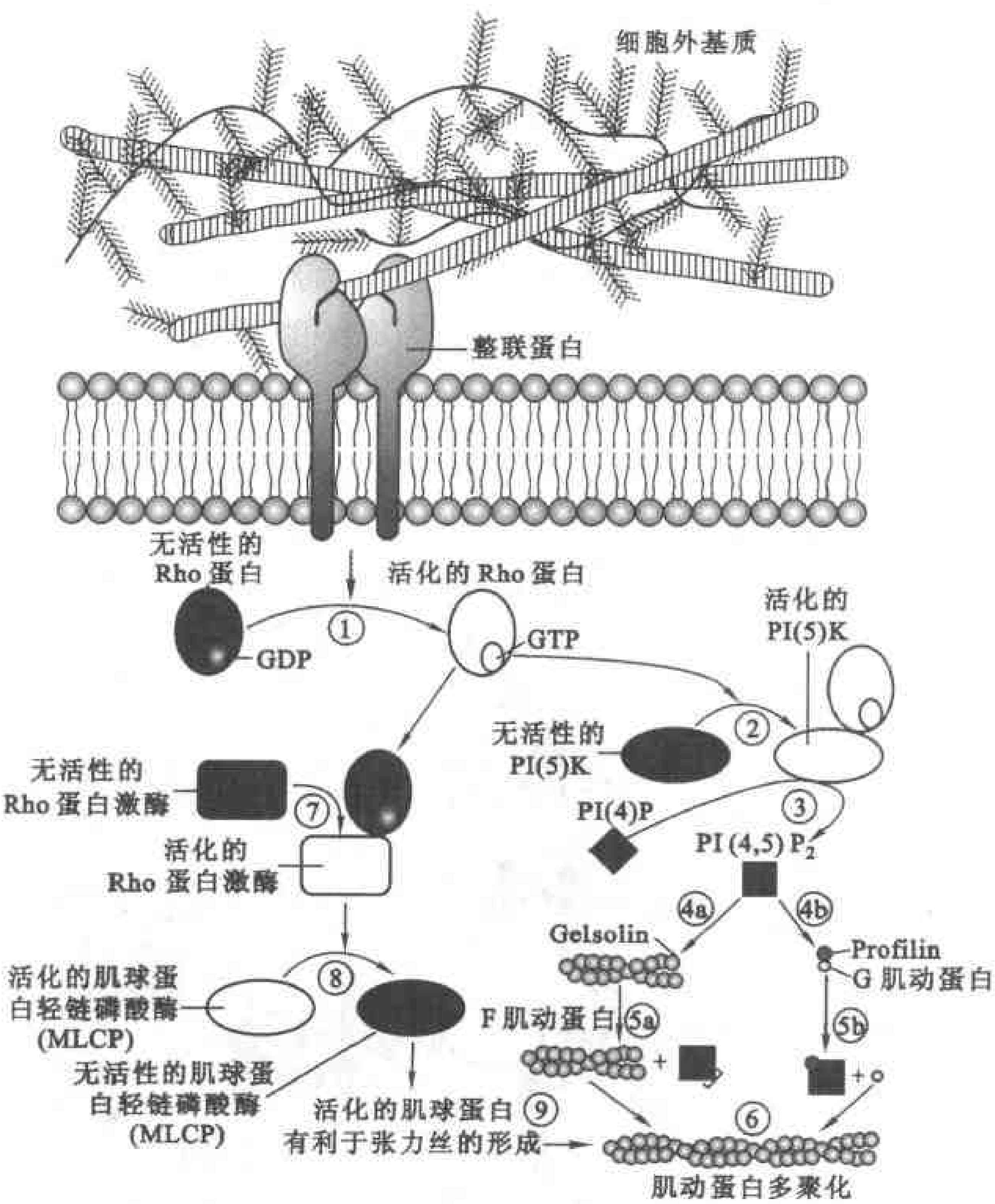


图 5－36 导致粘着斑装配的信号通路

胞外配体与整联蛋白结合，通过未确定途径导致 Rho 蛋白激活(Rho 蛋白和 Ras 蛋白一样，也是 GTP 调控蛋白家族成员之一，具有分子开关作用)，Rho－GDP 转换为 Rho－GTP(步骤 1)；Rho－GTP 活化两种不同的信号通路：一条通路表示在图右侧，Rho－GTP 激活磷脂酰肌醇 5－激酶 PI(5)K(步骤 2)；活化的 PI(5)K 使 PI(4)P 磷酸化生成 PI(4,5)P_2(步骤 3)；PI(4,5)P_2 结合许多靶蛋白，包括微丝结合蛋白 gelsolin(步骤 4a)和 profilin(步骤 4b)，从而引起这些微丝结合蛋白分别从它们与两种形式的肌动蛋白(F－actin、G－actin)形成的复

合物中解离出来(步骤 5a 和 5b);肌动蛋白单体(G - actin)的释放导致它们聚合到新暴露的微丝(F - actin)末端(步骤 6)。另一条通路表示在图左侧,Rho - GTP 与 Rho 激酶结合,活化该蛋白的激酶活性(步骤 7);活化的 Rho 激酶磷酸化并失活肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase,MLCP)活性(步骤 8);MLCP 的失活导致肌球蛋白活化,从而有利于肌动蛋白纤维(张力丝)的装配(步骤 9)。

通过粘着斑由整联蛋白介导的信号传递其通路有两条:

(1) 由细胞表面到细胞核的信号通路。细胞表面整联蛋白与胞外配体相互作用,导致整联蛋白簇集和粘着斑处质膜下酪氨酸激酶 Src 的活化;活化的 Src 使粘着斑激酶 FAK 的酪氨酸残基磷酸化;磷酸酪氨酸残基可结合具有 SH_2 结构域的接头蛋白 Grb2 和胞内鸟苷酸释放蛋白 Sos;活化的 Grb2 - Sos 复合物引起 Ras 蛋白 GTP - GDP 交换而活化;Ras - GTP 通过 MAPK 级联反应途径传递细胞生长促进信号到细胞核,激活涉及细胞生长与增殖相关的基因转录(图 5 - 37)。

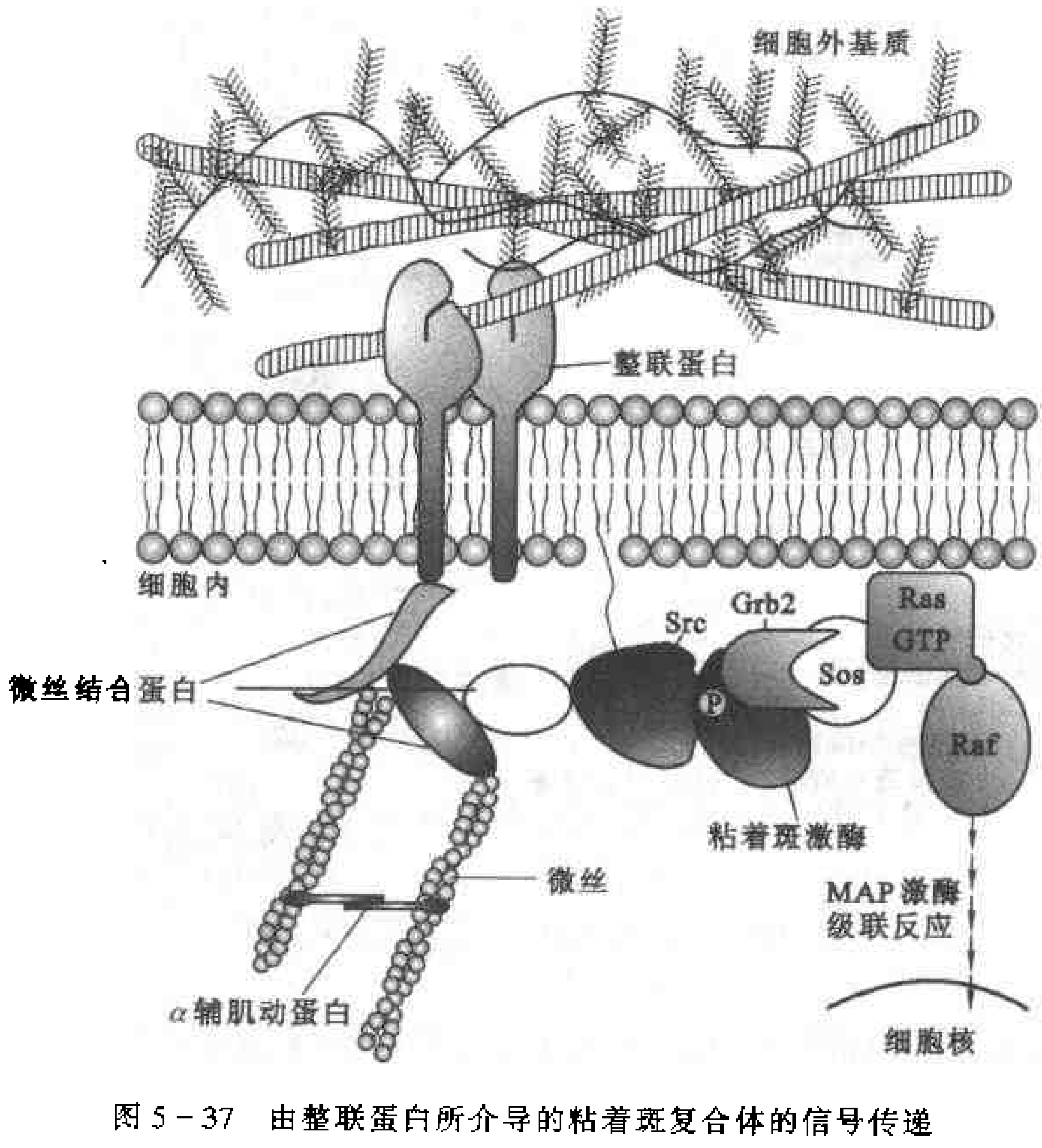


图 5 - 37　由整联蛋白所介导的粘着斑复合体的信号传递功能和机械结构功能示意图

(2) 由细胞表面到细胞质核糖体的信号通路。细胞核并非是由整联蛋白介导的源于胞外基质的信号的惟一的靶,另一条信号通路是将源于胞外基质的信号传递给细胞质蛋白质合成机器。当粘着斑激酶 FAK 的酪氨酸残基被磷酸化

后,与磷脂酰肌醇 3-羟基激酶 PI(3)K 的 SH_2 结构域结合;活化的 PI(3)K 催化产生两种磷脂酰肌醇衍生物:PI-3,4-二磷酸和 PI-3,4,5-三磷酸,两者作为膜结合信使活化激酶 $p70^{s6k}$,活化的 $p70^{s6k}$ 进而磷酸化核糖体小亚基的 S6 蛋白;含有磷酸化 S6 蛋白的核糖体被优先利用,翻译某些特定 mRNA、合成细胞从 G_1 期运行到 S 期所需要的某些蛋白。实验表明,如果用抗 $p70^{s6k}$ 的抗体显微注射到体外培养的成纤维细胞,则 DNA 复制的起始将被阻断。

五、细胞信号传递的基本特征与蛋白激酶的网络整合信息

(一) 细胞信号传递的基本特征

细胞的信号传递是多通路、多环节、多层次和高度复杂的可控过程。其主要特点概括如下:

(1) 多途径、多层次的细胞信号传递通路具有收敛(convergence)或发散(divergence)的特点。每种受体都能识别与结合各自的特异性配体,来自各种非相关受体的信号,可以在细胞内收敛成激活一个共同的效应器(如 Ras 或 Raf 蛋白)的信号,从而引起细胞生理、生化反应和细胞行为的改变(图 5-38)。另外,来自相同的配体(如表皮生长因子或胰岛素)的信号,又可发散激活各种不同的效应器,导致多样化的细胞应答。

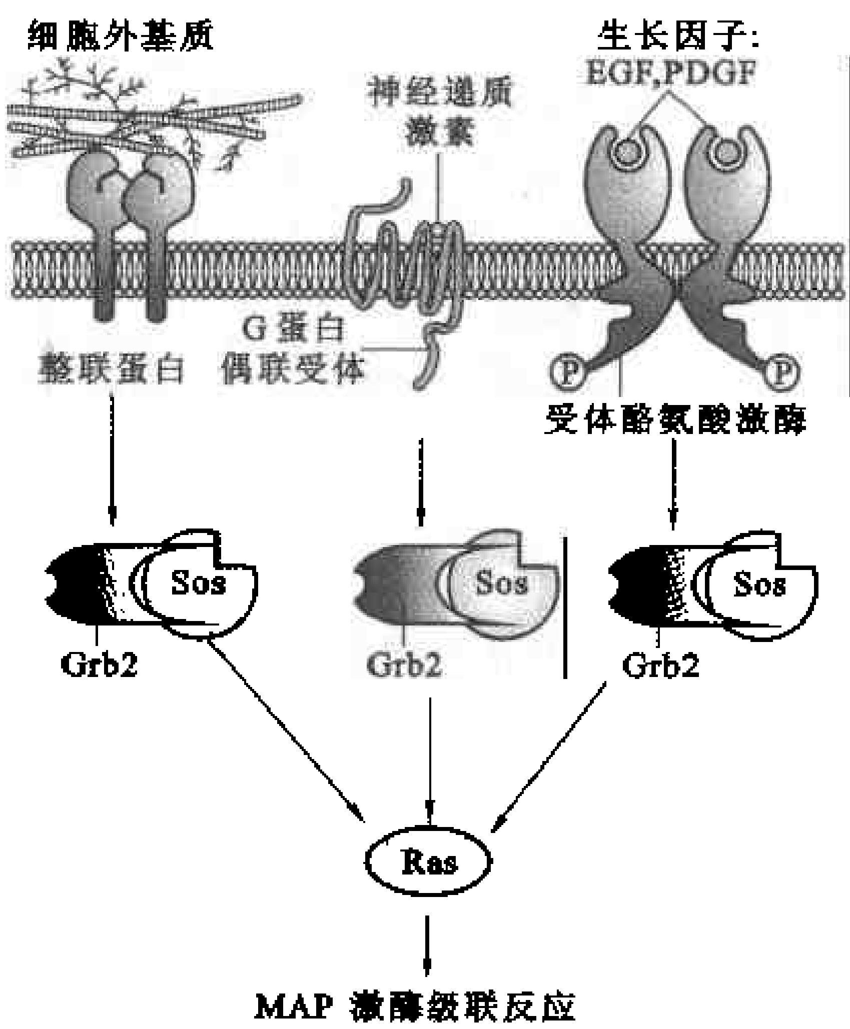


图 5-38 来自 G 蛋白偶联受体、整联蛋白和受体酪氨酸激酶所转导的信号都收敛到 Ras 蛋白,然后沿 MAPK 级联反应途径向下传递

(2) 细胞的信号转导既具有专一性又有作用机制的相似性。配体与受体在结构上的互补性是细胞信号转导具有专一性的重要基础，同时，又有作用机制的相似性，否则很难理解细胞面临几百种纷杂的胞外信号，只通过少数几种第二信使便可介导多种多样的细胞应答反应。正如信号通路的收敛或发散特征中所见到的情况，不同的外源信号可能诱导细胞产生相似的信号转导，如不同细胞因子与受体组成的复合体中往往含有共同亚基，由此诱导相似的信号转导；一种配体与受体结合可诱发多种信号转导途径，如在配体作用下 RTK 不同位点的酪氨酸残基自体磷酸化，可分别结合不同信号蛋白或接头蛋白，结果引出不同的信号通路；G 蛋白与受体偶联可介导腺苷酸环化酶和 PLC 等，分别引出 cAMP 和磷脂酰肌醇代谢两种信号通路。

(3) 信号转导过程具有信号放大作用，但这种放大作用又必须受到适度控制，这表现为信号的放大作用和信号所启动的作用的终止并存。正常生理条件下，激素配体本身对受体数目的影响即受体上升或下降调节(up or down regulation)，信号分子的磷酸化与去磷酸化，G 蛋白或 Ras 蛋白的 GTP 与 GDP 结合状态的可逆变化，Ca^{2+} 的释放与回收，第二信使的生成与降解等等机制，使信号转导精确而适度、不是持续的而是对胞外信号瞬间的反应。一旦破坏了这种正常的正、负反馈机制，细胞就会发生病变。

(4) 当细胞长期暴露在某种形式的刺激下，细胞对刺激的反应将会降低，这就是细胞进行适应。细胞以不同的方式产生对信号的适应：一是逐渐降低表面受体的数目，游离受体的减少降低了对外界信号的敏感度；二是快速钝化受体(受体本身脱敏)，从而降低受体和配体的亲和力，降低受体对胞外微量配体的敏感性；三是在受体已被激活的情况下，其下游信号蛋白发生变化，使通路受阻。这种适应是通过负反馈实现的，即强反应调节使其自身反应关闭的机制。

(二) 蛋白激酶的网络整合信息

前面介绍的各种不同的信号通路，主要是提供了信号途径本身的线性特征。然而，细胞无时无刻不处于复杂环境的“信息轰炸”之下，这些信号分别或协同启动细胞各种信号传递途径，最后作出合理的应答反应。因此，细胞各种不同的信号通路决不可能是彼此孤立的。细胞信号传递最重要的特征之一是构成一个复杂的信号网络系统(signal network system)，它具有高度的非线性特点(图 5－39)。人们对信号网络系统中各种通路之间的相互关系，形象地称之为“交谈”(cross talking)。也许可以把细胞信号传递比喻为电脑的工作，细胞接受的外界信号如同键盘输入的不同的字母或符号，细胞内各种信号通路及其组分如同电脑线路中的各种集成块，信号在这些集成块中流动，经分析、整合，最后将结果显示在荧光屏上。而在细胞中，这些经信号网络系统分析、整合后的信号最终表现为特定的生理功能。但是最复杂的电脑恐怕也无法和最简单的细胞相比，电脑作为无生命的机械装置，简单的操作失误或线路故障，都可导致整个系统的瘫痪；而细胞则有一定的自我修复和补偿能力。

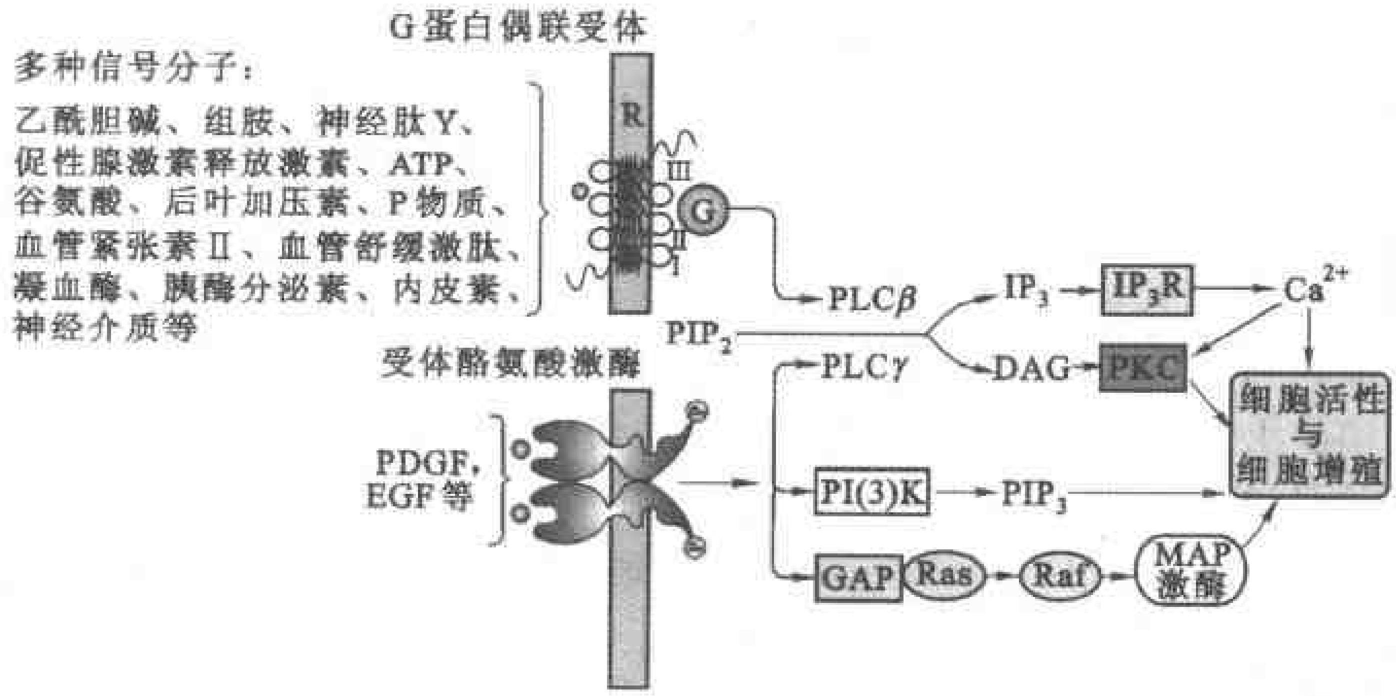


图 5-39 两类受体所介导的信号通路形成的信号网络系统示意图

该系统包括了信号传递途径的收敛、发散和交谈

自20世纪80年代中期以来，虽然对细胞信号系统的研究有了长足进展，但对其复杂关系的了解仍然是初步的。今后对以调节基因表达为主线的信号网络的研究，将会越来越受到重视。根据已有事实发现，通过蛋白激酶的网络整合信息调控复杂的细胞行为是不同信号通路之间实现 cross talking 的一种重要方式(图 5-40)。

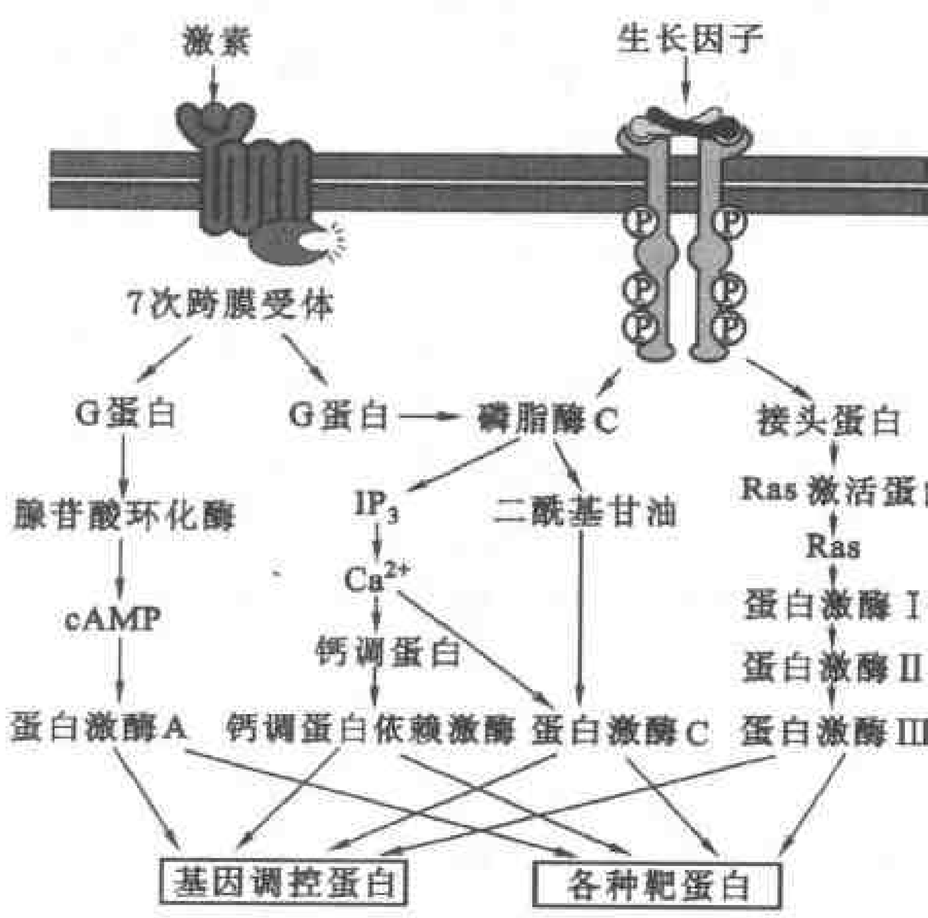


图 5-40 4条平行的胞内信号通路与它们之间的网络关系

上图概括了从细胞表面到细胞内的主要信号通路，从4条平行信号途径的比较不难发现：磷脂酶C既是G蛋白偶联受体信号途径的效应酶，又是RTK信

号途径的效应酶(具有 SH_2 结构域的信号蛋白),在两条信号通路中具有中介作用;4 条信号通路彼此不同但在运作机制上又具有相似的原理,最终都是激活蛋白激酶。由蛋白激酶形成的整合信息网络原则上可调节细胞任何特定的过程。有人估计,在一个哺乳类细胞中可能含有 1 000 种以上不同的蛋白激酶,约占 2% 的基因为其编码,因此,不难理解蛋白激酶的网络整合信息是不同信号通路之间实现 cross talking 的一种重要方式。

事实上,细胞信号网络的复杂性远比我们所了解的多得多。首先,还有许多信号途径被忽略;其次,对主要途径的相互作用,我们只涉及了蛋白激酶,其他的 cross talking 却没有描述。相信,对信号传递过程中 cross talking 的研究和对信号传递过程非线性内涵的认识,将对深入了解多基因表达调控机制、发育机理、病理过程及疾病控制产生十分重要的影响。

提　要

细胞膜是细胞与细胞外环境之间的一种选择性通透屏障,物质的跨膜运输对细胞的生存和生长至关重要。

被动运输包括简单扩散和载体介导的协助扩散,运输方向是由高浓度向低浓度。运输的动力来自物质的浓度梯度,不需要细胞提供代谢能量。除简单扩散外,负责物质跨膜转运的蛋白可分为两类:载体蛋白和通道蛋白,前者既可介导被动运输,又可介导主动运输;后者只能介导被动运输。每种载体蛋白能与特定的溶质分子结合,通过一系列构象改变介导溶质分子的跨膜转运。通道蛋白所介导的被动运输不需要与溶质分子结合,横跨膜形成亲水通道,允许适宜大小的分子和带电荷的离子通过。绝大多数的通道蛋白是多次跨膜的离子通道,具有两个显著特征:第一是具有离子选择性,而且转运速率高,净驱动力是溶质跨膜的电化学梯度;第二是离子通道是门控的,即离子通道的活性由通道开或关两种构象所调节,并通过通道开关应答于适当的信号。

主动运输是由载体蛋白所介导的物质逆浓度梯度或电化学梯度由浓度低的一侧向高浓度的一侧进行跨膜转运的方式。需要与某种释放能量的过程相偶联。主动运输过程可归纳为由 ATP 直接提供能量和间接提供能量以及光能驱动的三种基本类型。

Na^+-K^+ 泵是一种典型的主动运输方式,它是由 ATP 直接提供能量。动物细胞借助 Na^+-K^+ 泵维持细胞渗透平衡;同时利用胞外高浓度的 Na^+ 所储存的能量,主动从细胞外摄取营养。植物细胞、真菌(包括酵母)和细菌细胞其质膜上没有 Na^+-K^+ 泵,而是具有 H^+ 泵,将 H^+ 泵出细胞,建立跨膜的 H^+ 电化学梯度,利用 H^+ 电化学梯度来驱动主动转运溶质进入细胞。由 ATP 直接供能的钙泵用于维持细胞内低浓度的 Ca^{2+}。

协同运输是一类由 Na^+-K^+ 泵(或 H^+ 泵)与载体蛋白协同作用,靠间接消耗 ATP 所完成的主动运输方式。可分为共运输和对向运输。

不同方式的物质跨膜运动,结果是产生并维持了膜两侧不同物质特定的浓度分布。对某些带电荷的离子来说,就形成了膜两侧的电位差。细胞膜电位具有重要的生物学意义。

真核细胞通过胞吞作用和胞吐作用完成大分子与颗粒性物质的跨膜运输。胞吞作用又可分为两种类型:胞饮作用和吞噬作用,两者除胞吞泡大小不同以外,胞饮作用是一个连续发生的过程,所有真核细胞都能通过胞饮作用连续摄入溶液和分子;吞噬作用首先需要被吞噬物与细胞表面结合并激活细胞表面受体,因此是一个信号触发过程。胞饮泡的形成需要网格蛋白、接合素蛋白和结合蛋白等帮助。吞噬泡的形成则需要有微丝及其结合蛋白的帮助,在多细胞动物体内,只有某些特化细胞具有吞噬功能。受体介导的胞吞作用是大多数动物细胞通过网格蛋白有被小泡从胞外液摄取特定大分子的有效途径。

胞吐作用是将细胞内的分泌泡或其他某些膜泡中的物质通过细胞质膜运出细胞的过程。所有真核细胞都有组成型的胞吐途径,特化的分泌细胞还有一种调节型胞吐途径。

无论是胞吞作用还是胞吐作用,都是通过膜泡运输的方式进行的,这种动态过程对质膜更新和维持细胞的生存与生长是必要的。胞吞作用和胞吐作用都涉及到膜的融合,现在已鉴定有膜融合蛋白参与催化,以克服质膜融合过程中的能量障碍。

多细胞生物是一个繁忙而有序的细胞社会,这种社会性的维持不仅依赖于细胞的物质代谢与能量代谢,还有赖于细胞通讯与信号传递,以协调细胞的行为。细胞接受外界信号,通过一整套特定的机制,实现信号的跨膜转导,最终调节特定基因的表达,引起细胞的应答反应,这是细胞信号系统的主线,这种反应系列称之为细胞信号通路。细胞信号传递的通路随信号的受体存在的部位不同可分为两大类:一是通过细胞内受体介导的信号传递,一些亲脂性小分子(如甾类激素)可通过质膜与细胞内受体结合传递信号,进而诱导基因活化,这一过程可分为初级反应阶段和延迟的次级反应阶段;二是通过细胞表面受体介导的信号传递,亲水性化学信号分子(包括神经递质、蛋白激素、生长因子等)一般不能直接进入细胞,而是通过与细胞表面特异受体的结合,进行信号转导继而对靶细胞产生效应。根据信号转导机制和受体蛋白类型的不同,细胞表面受体分属三大家族:① 离子通道偶联的受体;② G 蛋白偶联的受体;③ 与酶连接的受体。

离子通道偶联的受体是由多亚基组成的受体－离子通道复合体,本身既有信号结合位点,又是离子通道,其跨膜信号转导无需中间步骤。

G 蛋白偶联的受体是细胞表面由单条多肽经 7 次跨膜形成的受体,该信号通路是指配体－受体复合物与靶蛋白(酶或离子通道)的作用要通过与 G 蛋白的偶联,在细胞内产生第二信使,从而将胞外信号跨膜传递到胞内,影响细胞的行为。根据产生第二信使的不同,又可分为 cAMP 信号通路和磷脂酰肌醇信号通路。cAMP 信号通路的主要效应是激活靶酶和开启基因表达,这是通过蛋白激酶 A 完成的。该信号途径涉及的反应链可表示为:激素→G 蛋白偶联受体→

G 蛋白→腺苷酸环化酶→cAMP→cAMP 依赖的蛋白激酶 A→基因调控蛋白→基因转录。磷脂酰肌醇信号通路的最大特点是胞外信号被膜受体接受后，同时产生两个胞内信使，分别启动两个信号传递途径即 IP_3-Ca^{2+} 和 DG－PKC 途径，实现细胞对外界信号的应答，因此，把这一信号系统又称之为“双信使系统”

受体酪氨酸激酶（RTKs）是细胞表面一大类重要酶连受体家族，当配体与受体结合，导致受体二聚化，激活受体的酪氨酸蛋白激酶活性，随即引起一系列磷酸化级联反应，终致细胞生理和/或基因表达的改变。RTK－Ras 信号通路是这类受体所介导的重要信号通路，具有广泛的功能，包括调节细胞的增殖与分化，促进细胞存活，以及细胞代谢过程中的调节与校正作用。RTK－ Ras 信号通路的基本模式是：配体→RTK→adaptor←GRF→Ras→Raf（MAPKKK）→MAPKK→MAPK→进入细胞核→其他激酶或基因调控蛋白（转录因子）的磷酸化修饰。

现已知的酶连受体都是跨膜蛋白，除受体酪氨酸激酶外，还包括受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体酪氨酸磷酸酯酶、受体鸟苷酸环化酶和酪氨酸蛋白激酶联系的受体等几种类型。此外，整联蛋白是细胞表面的跨膜蛋白（异二聚体），不仅介导细胞附着到胞外基质上，更重要的是提供了一种细胞外环境调控细胞内活性的渠道。整联蛋白与胞外配体（如纤连蛋白）相互作用，可产生多种信号，如 Ca^{2+} 释放进入细胞质基质，肌醇第二信使的合成，胞内蛋白酪氨酸残基的磷酸化等。

细胞的信号传递是多通路、多环节、多层次和高度复杂的可控过程。具有许多重要特征：多途径、多层次的细胞信号传递通路具有收敛或发散的特点；细胞的信号转导既具有专一性又有作用机制的相似性；细胞信号传递构成一个复杂的信号网络系统，它具有高度的非线性特点，即信号网络系统中各通路之间存在 cross talking 的相互关系。

思考题

1. 比较主动运输与被动运输的特点及其生物学意义。
2. 说明 Na^+-K^+ 泵的工作原理及其生物学意义。
3. 动物细胞、植物细胞和原生动物细胞应付低渗膨胀的机制有何不同？
4. 比较胞饮作用和吞噬作用的异同。
5. 比较组成型胞吐途径和调节型胞吐途径的特点及其生物学意义。
6. 试述细胞以哪些方式进行通讯？各种方式之间有何不同？
7. 细胞有哪几种方式通过分泌化学信号进行细胞间相互通讯？
8. 何谓信号传递中的分子开关蛋白？举例说明其作用机制。
9. 简要说明 G 蛋白偶联受体介导的信号通路有何特点。
10. 概述受体酪氨酸激酶介导的信号通路的组成、特点及其主要功能。
11. 请总结细胞信号传递的主要特点并举例说明。

参考文献

1. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: concepts and experiments. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999

2. Bruce Alberts *et al*. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. New York & London: Garland Publishing, Inc., 1994

3. Bruce Alberts *et al*. Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing, Inc., 1998

4. J Wess. G protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G protein recognition. Faseb Journal, 4, 1997, 11(5): 346～354

5. John H Exton. Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. Eur. J. Biochem, 1997, 243: 10～20

6. 翟中和主编. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 1995

7. 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图主编. 细胞生物学. 第二版. 北京: 北京师范大学出版社, 1998

第六章

细胞质基质与细胞内膜系统

在光学显微镜下，生活的真核细胞的细胞质内几乎看不到什么结构。直到20世纪初，观察染色的组织学切片提示人们，在细胞质内似乎存在一个膜相网络。电镜出现后，通过形态学观察和生化证据使人们确认，真核细胞的细胞质内具有发达的内膜系统(endomembrane system)，形成了细胞质基质以及膜围绕的细胞器。

细胞的内膜系统是在结构、功能乃至发生上相关的，由膜围绕的细胞器或细胞结构。主要包括内质网、高尔基体、溶酶体、胞内体和分泌泡等。过氧化物酶体与溶酶体有某些类似之处，但又是完全不同的两种细胞器，为便于与溶酶体进行比较，因此也在本章讨论。

第一节　细胞质基质

在真核细胞的细胞质中，除去可分辨的细胞器以外的胶状物质，称细胞质基质(cytoplasmic matrix or cytomatrix)。细胞质基质是细胞的重要的结构成分，其体积约占细胞质的一半(表6-1)。细胞与环境，细胞质与细胞核，以及细胞器之间的物质运输、能量交换、信息传递等都要通过细胞质基质来完成，很多重要的中间代谢反应也发生在细胞质基质中。近年来发现，细胞质基质还担负着多种其他的重要功能。在细胞质基质中，各种复杂的代谢反应是如何有条不紊地进行的，各个代谢环节之间是如何相互关联、相互制约的？数以千种的生物大分子和代谢产物(或底物)又是如何定向地转运的？调节细胞增殖、分化、衰老与凋亡等重大生命活动的细胞信号转导及其网络的确切途径是什么？这些都是细胞生物学所要回答的基本问题。然而与细胞核和其他细胞器相比较，人们对细胞质基质的认识还是相当肤浅的，在研究细胞质基质过程中，曾赋予它诸如细胞液(cell sap)、透明质(hyaloplasm)、胞质溶胶(cytosol)、细胞质基质等十几个名称，其涵义也不断地更新与完善，这既反映了从不同的侧面与层次对细胞质基质的了解，也反映了对细胞质基质认识的不断深入。由于细胞质基质的独特结构特征及较大的研究难度，以至于现在还没有一个确切而统一的概念。目前常用的

名称是细胞质基质和胞质溶胶，二者虽有差异但常常等同使用。也有的学者把它们看作既密切相关但又明显不同的两个概念。

表 6－1　肝细胞中细胞质基质及细胞其他组分的数目及所占的体积比

（引自 Albert，1998）

细胞组分	数　目	体积比
细胞质基质	1	54
细胞核	1	6
内质网	1	12
高尔基体	1	3
溶酶体	300	1
胞内体	200	1
过氧化物酶体	400	1
线粒体	1 700	22

很多学者特别是生物化学家曾一度把细胞质基质看成是酶的溶液。然而，无论从结构还是功能上看，细胞质基质都不是简单的酶溶液，越来越多的证据表明，细胞质基质很可能是高度有组织的体系。

一、细胞质基质的涵义

在细胞质基质中，主要含有与中间代谢有关的数千种酶类，与维持细胞形态和细胞内物质运输有关的细胞质骨架结构。从物质代谢与形态结构的角度考虑，有人还把糖原和脂滴等内含物也看作是细胞质基质的组分。

用差速离心的方法分离细胞匀浆物中的各种细胞组分，先后除去细胞核、线粒体、溶酶体、高尔基体和细胞膜等细胞器或细胞结构后，存留在上清液中的主要是细胞质基质的成分。生物化学家多称之为胞质溶胶。

在细胞质基质中蛋白质含量约占 20%～30%，形成一种粘稠的胶体，多数的水分子是以水化物的形式紧密地结合在蛋白质和其他大分子表面的极性部位，只有部分水分子以游离态存在，起溶剂作用（图 6－1）。细胞质基质中蛋白质分子和颗粒性物质的扩散速率仅为水溶液中的 1/5，更大的结构如分泌泡和细胞器等则固定在细胞质基质的某些部位上，或沿细胞骨架定向运动。细胞质基质是蛋白质与脂肪合成的重要场所。在细胞质基质中合成的蛋白质，半数以上将分门别类地转移到细胞核和细胞器中。在细胞质基质中，各种代谢活动高效有序地进行，各种代谢途径之间的协调有序以及所涉及的物质、能量与信息的定向转移和传递，这些复杂的生命过程都不是简单的“酶溶液”所能完成的。

最近人们注意到，在细胞质基质中多数蛋白质，其中包括水溶性蛋白，并不是以溶解状态存在的。免疫荧光技术显示，与酵解过程有关的一些酶就是结合在微丝上，在骨骼肌细胞中则结合在肌原纤维的某些特殊位点上。这种特异性的结合不仅与细胞的生理状态有关，而且也与组织发育和细胞分化的程度有关。

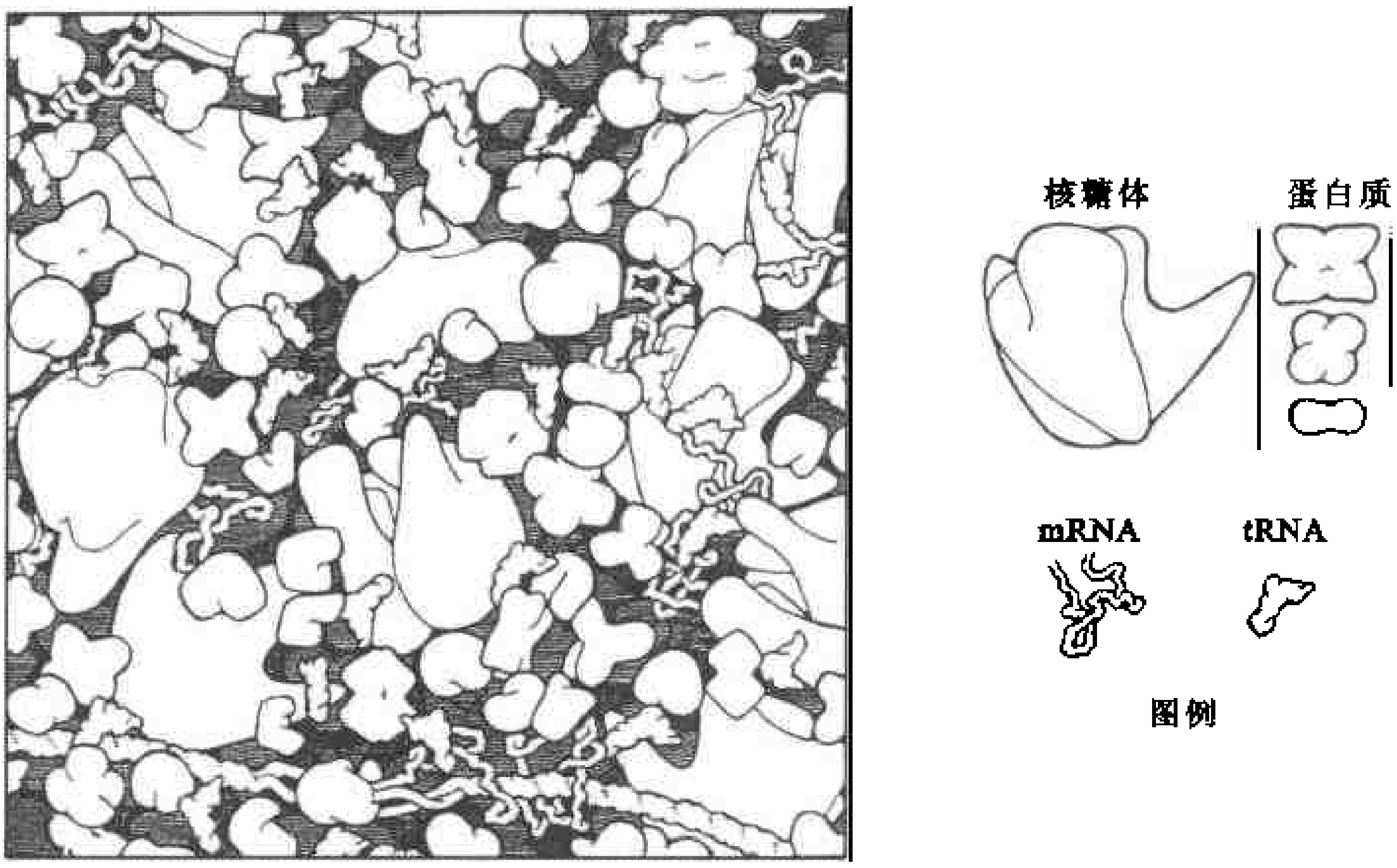


图 6－1　根据细胞质中各种生物大分子结构的实际数目与相对大小所绘制的细胞质基质结构的示意图

酶与微丝结合后，酶的动力学参数也发生了明显的变化。用原位杂交技术还显示，mRNA 在细胞中也呈区域性分布，在卵母细胞中不同种的 mRNA 定位于细胞质基质的不同部位，卵细胞在母体发生期间，由蛋白质和 RNA 在细胞质基质中的特定分布而形成的位置信息，往往对子代个体胚胎发育早期的细胞分化起着重要的作用。

关于细胞质基质特别是处在细胞分裂期的细胞质基质的组织程度，还是一个有争议的问题。但根据已有的证据以及对其功能的了解，人们推测，细胞质基质是一个高度有序的体系。其中细胞质骨架纤维贯穿在粘稠的蛋白质胶体中，多数的蛋白质直接或间接地与骨架结合，或与生物膜结合，从而完成特定的生物学功能。如与酵解有关的酶类，彼此之间可能以弱键结合在一起形成多酶复合体，定位在细胞质基质的特定部位，催化从葡萄糖至丙酮酸的一系列反应。前一个反应的产物即为下一个反应的底物，二者间的空间距离仅为几个纳米，各个反应途径之间也以类似的方式相互关联，从而有效地完成复杂的代谢过程。

目前，人们仍在从细胞超微结构与生物化学等不同侧面的互相结合来研究细胞质基质中特殊的复杂结构体系。在细胞质基质中，蛋白质与蛋白质之间，蛋白质与其他大分子之间都是通过弱键而相互作用的，并且常常处于动态平衡之中。这种结构体系的维持只能在高浓度的蛋白质及其特定的离子环境的条件之下实现。一旦细胞破裂，甚至在稀释的溶液中，这种靠分子之间脆弱的相互作用而形成的结构体系就会遭到破坏。这正是研究细胞质基质比研究其他细胞器困难的主要原因。

二、细胞质基质的功能

细胞质基质担负着一系列重要的功能。目前了解最多的是许多中间代谢过程都在细胞质基质中进行,如糖酵解过程、磷酸戊糖途径、糖醛酸途径、糖原的合成与部分分解过程等等。蛋白质的合成与脂肪酸的合成也在细胞质基质中进行。尽管人们对这些代谢反应的具体生化步骤早已比较清楚,但对它们在细胞质基质中进行反应的细节,特别是反应的底物和产物如何定向转运的机制还了解得不多。细胞信号转导是细胞代谢及细胞增殖、分化、衰老和凋亡的基本调控途径。多种信号通路如何在细胞质中形成信号网络及各条通路中信号分子交谈(crosstalking)知之甚少。近些年来所取得的最主要的进展是:蛋白质在细胞质基质中的分选及其转运机制的研究。如证明了N端含有某种信号序列的蛋白质合成起始后很快就转移到内质网上,以及在蛋白质合成后如何通过膜泡运输的方式由内质网转运至高尔基体。其他蛋白质的合成均在细胞质基质中完成,并根据蛋白自身所携带的信号,分别转运到线粒体、叶绿体、微体以及细胞核中,也有些蛋白则驻留在细胞质基质中,构成本身的结构成分。

细胞质基质另一方面的功能是与细胞质骨架相关的。细胞质骨架作为细胞质基质的主要结构成分,不仅与维持细胞的形态、细胞的运动、细胞内的物质运输及能量传递有关(见第十章细胞骨架),而且也是细胞质基质结构体系的组织者,为细胞质基质中其他成分和细胞器提供锚定位点。有人估计一个直径为16μm的细胞,其细胞骨架的表面积可达$50\times10^3\sim100\times10^3\mu m^2$,而相同直径的球形细胞的表面积仅有$0.8\times10^3\mu m^2$。这样大的表面积不仅限制了水分子的运动,而且把蛋白质、mRNA等生物大分子固定在特定的位点,在细胞质基质中形成了更为精细的区域,使复杂的代谢反应高效而有序地进行,其功能在某种程度上类似于细胞的内膜系统,使细胞有了细胞核与细胞质及各种膜围绕的细胞器的区分。所不同的是,在细胞质基质中不是靠生物膜来划分和把蛋白质分子限定在膜的二维平面上,而是通过与骨架蛋白分子间的选择性结合,使生物大分子锚定在细胞骨架三维空间的特定区域。

除此之外,细胞质基质在蛋白质的修饰、蛋白质选择性的降解等方面也起着重要作用。

1. 蛋白质的修饰

已发现有100余种的蛋白质侧链修饰,绝大多数的修饰都是由专一的酶作用于蛋白质侧链特定位点上。侧链修饰对细胞的生命活动是十分重要的,但很多修饰的生物学意义至今尚不清楚。在细胞质基质中发生蛋白质修饰的类型主要有:

(1) 辅酶或辅基与酶的共价结合。

(2) 磷酸化与去磷酸化,用以调节很多蛋白质的生物活性。

(3) 糖基化。糖基化主要发生在内质网和高尔基体中,在细胞质基质中发

现的糖基化是指在哺乳动物的细胞中把 *N* - 乙酰葡萄糖胺分子(*N*-acetyl-glucosamine)加到蛋白质的丝氨酸残基的羟基上。

(4) 对某些蛋白质的 N 端进行甲基化修饰。这种修饰的蛋白质,如很多细胞骨架蛋白和组蛋白等,不易被细胞内的蛋白水解酶水解,从而使蛋白在细胞中维持较长的寿命。

(5) 酰基化。最常见的一类酰基化的修饰是内质网上合成的跨膜蛋白在通过内质网和高尔基体的转运过程中发生的,它由不同的酶来催化,把软脂酸链共价地连接在某些跨膜蛋白的暴露在细胞质基质中的结构域;另一类酰基化修饰发生在诸如 *src* 基因和 *ras* 基因这类细胞癌基因的产物上,催化这一反应的酶可识别蛋白中的信号序列,将脂肪酸链共价地结合到蛋白质特定的位点上。如 *src* 基因编码的酪氨酸蛋白激酶,与豆蔻酸的共价结合。酰基化与否并不影响酪氨酸蛋白激酶的活性,但只有酰基化的激酶才能转移并靠豆蔻酸链结合到细胞膜上,也只有这样,细胞才可能被转化。

2. 控制蛋白质的寿命

细胞中的蛋白质处于不断地降解与更新的动态过程中。细胞质基质中的蛋白质大部分寿命较长,其生物活性可维持几天甚至数月,但也有一些寿命很短,合成后几分钟就降解了,其中包括在某些代谢途径中,催化限速反应步骤的酶和 *fos* 等细胞癌基因的产物。这样,只要通过改变它们的合成速度,就可以控制其浓度,从而达到调节代谢途径或细胞生长与分裂的目的。

在蛋白质分子的氨基酸序列中,除了有决定蛋白质在细胞内定位的信号和与修饰作用有关的信号外,还有决定蛋白质寿命的信号。这种信号存在于蛋白质 N 端的第一个氨基酸残基,若 N 端的第一个氨基酸是 Met(甲硫氨酸)、Ser(丝氨酸)、Thr(苏氨酸)、Ala(丙氨酸)、Val(缬氨酸)、Cys(半胱氨酸)、Gly(甘氨酸)或 Pro(脯氨酸),则蛋白质是稳定的;如是其他 12 种氨基酸之一,则是不稳定的。每种蛋白质开始合成时,N 端的第一个氨基酸都是甲硫氨酸(细菌中为甲酰甲硫氨酸),但合成后不久便被特异的氨基肽酶水解除去,然后由氨酰 - tRNA 蛋白转移酶(aminoacyl-tRNA-protein transferase)把一个信号氨基酸加到某些蛋白质的 N 端,最终在蛋白质的 N 端留下一个不稳定的或稳定的氨基酸残基。

对控制这一反应的机制还了解不多。在真核细胞的细胞质基质中,有一个很复杂的机制,识别蛋白质 N 端不稳定的氨基酸信号并准确地将这种蛋白质降解,是依赖于泛素的降解途径(ubiquitin-dependent pathway)。泛素是一个由 76 个氨基酸残基组成的小分子蛋白,具有多种生物学功能。在蛋白质降解过程中,多个泛素分子共价结合到含有不稳定氨基酸残基的蛋白质的 N 端,然后一种 26*S* 的蛋白酶复合体或称蛋白酶体(proteosome)将蛋白质完全水解。26*S* 的蛋白酶体由一个筒状的 20*S* 的催化核心(由 14 种多肽,28 个亚基组成)和一个称为 PA700 的调节部分(由 15 个亚基组成)组成(图 6 - 2)。蛋白酶体的含量占细胞蛋白总量的 1%。这种依赖于泛素的蛋白酶体,还参与细胞周期调控过程(详见第十一章细胞增殖及其调控)。

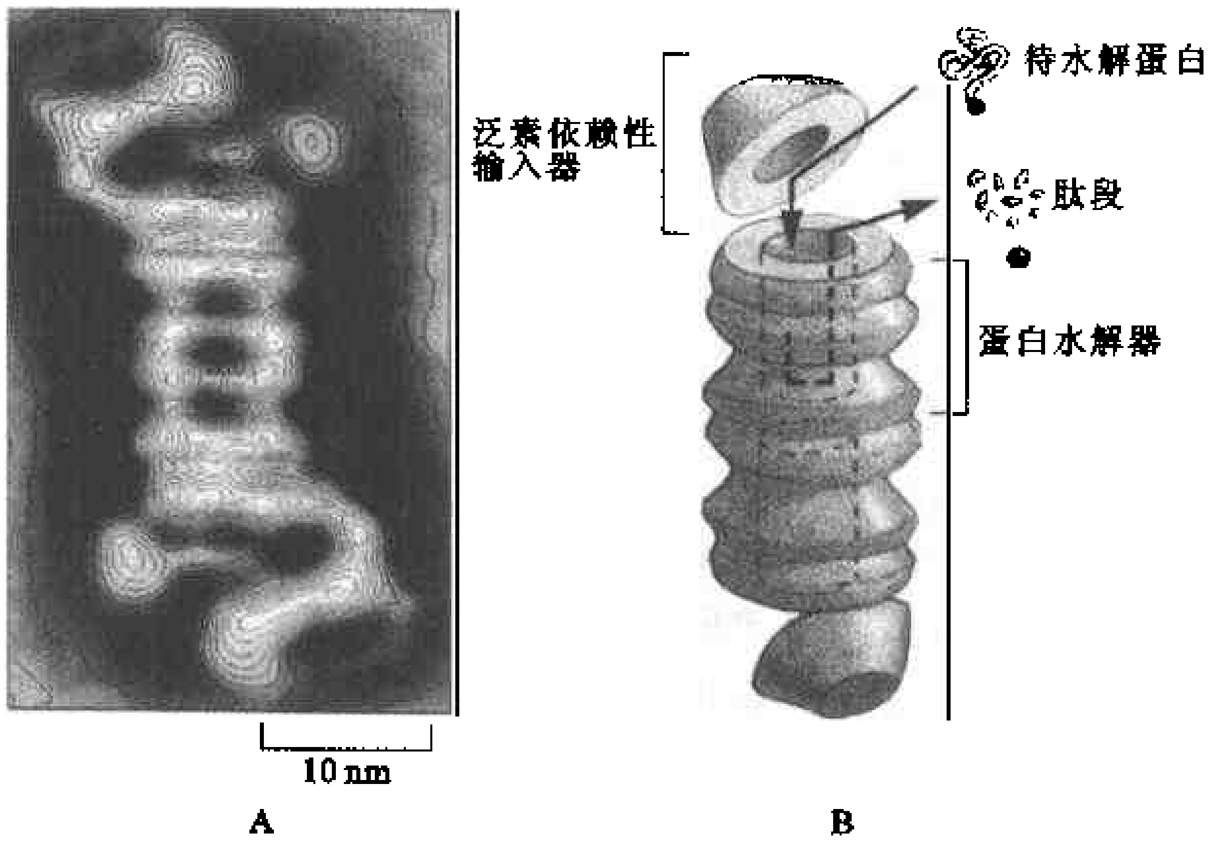


图 6-2 根据电镜观察结果绘制的蛋白酶体结构
(A)及其水解蛋白过程的示意图(B)

3. 降解变性和错误折叠的蛋白质

细胞质基质中的变性蛋白、错误折叠的蛋白、含有被氧化或其他非正常修饰氨基酸的蛋白,不管其 N 端氨基酸残基是否稳定,也常常很快被清除。推测这种蛋白质的降解作用,可能涉及对畸形蛋白质所暴露出来的氨基酸疏水基团的识别,并由此启动对蛋白质 N 端第一个氨基酸残基的作用,其结果形成了 N 端不稳定的氨基酸,同样被依赖于泛素的蛋白降解途径彻底水解。在细胞质基质中,正在合成的蛋白质的构象与错误折叠的蛋白质有很多类似之处,如加入蛋白质合成抑制剂,则停留在不同阶段大小不等的多肽链很快被降解,说明蛋白质合成的复合物对延伸中的肽链有暂时的保护作用。

4. 帮助变性或错误折叠的蛋白质重新折叠,形成正确的分子构象

这一功能主要靠热休克蛋白(heat shock protein, Hsp 或称 stress-response protein)来完成。DNA 序列分析表明,热休克蛋白有主要 3 个家族,即 Mr 为 25×10^3、70×10^3 和 90×10^3 的蛋白,每一家族中都有由不同基因编码的数种蛋白成员。有的基因在正常条件下表达,有些则在温度增高或其他异常情况下大量表达,以保护细胞,减少异常环境的损伤。有证据表明,在正常细胞中,热休克蛋白选择性地与畸形蛋白质结合形成聚合物,利用水解 ATP 释放的能量使聚集的蛋白质溶解,并进一步折叠成正确构象的蛋白质。

三、细胞质基质与胞质溶胶

细胞质基质和胞质溶胶是从不同的角度提出的概念,二者虽然有一些差别,但过去在不少书中,常把这两个名词等同起来。随着人们对细胞质基质的研究,

特别是对细胞骨架的研究不断深入，有些学者对细胞质基质的概念提出了一些新的理解，认为细胞质基质主要是由微管、微丝和中间纤维等形成的相互联系的结构体系。其中蛋白质和其他分子以凝聚状态或暂时的凝聚状态存在，与周围溶液的分子处于动态平衡。包括作为细胞质基质主要成分的多种酶和代谢中间产物，以及呈溶解状态存在的微管蛋白。对一种蛋白来说是否属于细胞质基质中的结构成分，主要取决于其在细胞生命活动中，是结合在细胞质骨架上，还是游离在周围的溶液中。蛋白质等多种物质特异性地结合在骨架纤维上，其周围又吸附了多种分子，在不同程度上影响和改变了周围溶液的某些物理性质。这样一种有精细区域化的凝胶结构体系，在不同细胞的不同发育阶段和不同生理状态下，可能有所不同，以完成多种复杂的生物学功能。

前面曾提到，用差速离心的方法分离细胞匀浆中的各种细胞组分，最终可获得富含蛋白质的组分。早期的实验细胞学家和生化学家称之为胞质溶胶。胞质溶胶的成分是否与细胞质基质周围溶液的成分相同呢？Paine把乳胶小球注射到非洲爪蟾的卵母细胞中，经过一段时间之后，取出乳胶小球，用聚丙烯酰胺双向凝胶电泳技术分析了渗入乳胶小球中的蛋白质成分，并与周围细胞质中的蛋白质成分进行比较。结果发现，在所检测的90多种多肽中，80%多肽未曾扩散到乳胶小球中，而是结合在细胞质基质上。另一些实验表明，mRNA和核糖体也都是结合在细胞质基质上。显然，用差速离心的方法所获得的胞质溶胶的成分与细胞质基质周围的溶液成分有很大的不同。胞质溶胶中的多数蛋白质，特别是相对分子质量较大的蛋白质，可能通过较弱的次级键直接或间接地结合在细胞质基质的骨架纤维上。

也有一些学者试图把细胞质骨架排除在细胞质基质概念之外。细胞质骨架固然是细胞中主要结构体系，然而离开了细胞质骨架的支持与组织，细胞质基质中的其他成分就失去了锚定的位点，随之也就丧失了这种复杂的高度有序的结构，也就无法完成各种生物学功能。从细胞骨架的角度来看，骨架的主要成分，特别是微管和微丝的装配和解聚与周围的液相始终处在一种动态平衡之中，离开这种特定的环境，骨架系统也难以行使其功能。

第二节 内 质 网

内质网(endoplasmic reticulum，ER)是真核细胞重要的细胞器。它由封闭的膜系统及其围成的腔形成互相沟通的网状结构。内质网通常占细胞膜系统的一半左右，体积约占细胞总体积的10%以上。在不同类型的细胞中，内质网的数量、类型与形态差异很大。同一细胞在不同发育阶段和不同的生理状态下，内质网的结构与功能也发生明显变化。在细胞周期的各个阶段，内质网的变化是极其复杂的。细胞分裂时，内质网要经历解体与重建的过程。由于内质网的存在，大大增加了细胞内膜的表面积，为多种酶特别是多酶体系提供了大面积的结合位点。同时内质网形成的完整封闭体系，将内质网上合成的物质与细胞质基质

中合成的物质分隔开来，更有利于它们的加工和运输。

内质网是细胞内除核酸以外的一系列重要的生物大分子，如蛋白质、脂质和糖类合成的基地，其合成上述物质的种类与细胞质基质中合成的物质有明显的不同。

原核细胞内没有内质网，由细胞膜代行其某些类似的职能。

内质网的发现要比线粒体和高尔基体等细胞器晚得多。1945 年，K.R. Porter 等人在组织培养细胞中初次观察到细胞质的内质部分有网状结构，建议叫做内质网。随着超薄切片和固定技术的改进，Palade 和 Porter 等人，于 1954 年证实内质网是由膜围绕的囊泡所组成。虽然以后发现的内质网不仅仅存在于细胞的内质部位，但仍习惯延用此名称。

生物化学家曾从细胞质中分离出大量称为微粒体(microsome)的结构，实际上这是在细胞匀浆和超速离心过程中，由破碎的内质网形成的近似球形的囊泡结构，它包含内质网膜与核糖体两种基本组分。虽然这是形态上的人工产物，但在生化研究中，常常把微粒体与内质网等同看待。在体外实验中，微粒体仍具有蛋白质合成，蛋白质的糖基化和脂质合成等内质网的基本功能。

一、内质网的两种基本类型

根据结构与功能，内质网可分为两种基本类型：糙面内质网(rough endoplasmic reticulum，rER)和光面内质网(smooth endoplasmic reticulum，sER)。

糙面内质网多呈扁囊状，排列较为整齐，因在其膜表面分布着大量的核糖体而命名。它是内质网与核糖体共同形成的复合机能结构，其主要功能是合成分泌性的蛋白和多种膜蛋白。因此在分泌细胞(如胰腺腺泡细胞)和分泌抗体的浆细胞中，糙面内质网非常发达(图 6－3)，而在一些未分化的细胞与肿瘤细胞中则较为稀少。内质网膜上有一种称为易位子(translocon)的蛋白复合体，直径约 8.5 nm，中心有一个直径为 2 nm 的“通道”(图 6－4)，其功能与新合成的多肽进人内质网有关。在哺乳动物细胞中，移位子的主要成分是与蛋白分泌相关的一种多肽 Sec61p 等组成的复合物。

表面没有核糖体结合的内质网称光面内质网。光面内质网常为分支管状，形成较为复杂的立体结构(图 6－5)。

光面内质网是脂质合成的重要场所，细胞中几乎不含有纯的光面内质网，它们只是作为内质网这一连续结构的一部分。光面内质网所占的区域通常较小，往往作为出芽的位点，将内质网上合成的蛋白质或脂质转移到高尔基体内。在某些细胞中，光面内质网非常发达并具有特殊的功能，如合成固醇类激素的细胞及肝细胞等。

用密度梯度离心技术可将肝细胞中的光面内质网和糙面内质网分离出来。糙面内质网上有 20 余种与光面内质网上不同的蛋白质。既然内质网是一个连续的整体结构，因此，在内质网膜上可能有某些特殊的装置，将光面内质网与糙

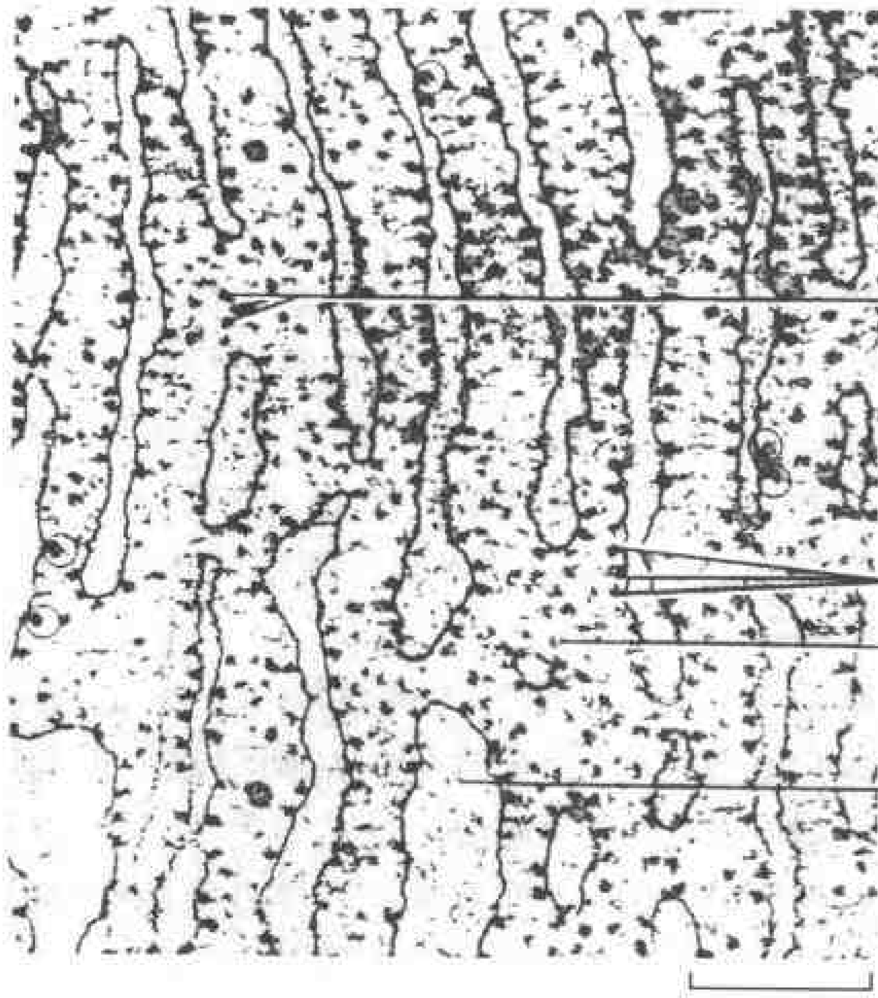


图 6－3　胰腺腺泡细胞中发达的糙面内质网
（Darnell *et al*.，1986）

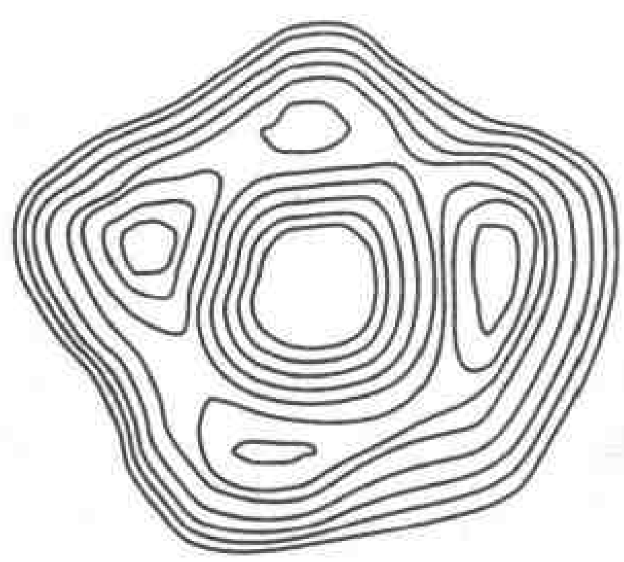


图 6－4　根据冷冻蚀刻电镜图片所绘制的移位子示意图

面内质网的部位间隔开来，并维持其形态。否则在内质网膜这个二维的流体结构中，不同区域的脂质和蛋白质就会因侧向扩散而趋于平衡。

内质网与其他细胞器关系的研究，对阐明细胞的一些生理生化过程及细胞器的发生与进化是很有意义的，也提出了一些有启示性的设想。

超微结构研究表明，向内折叠的细胞膜有时与内质网相连接，甚至有管道相通。原核细胞的细胞膜内侧有时附着大量核糖体，因而一些人认为在细胞进化过程中，内质网可能由细胞膜演化而来。内质网膜常与外层核膜连接，内质网的腔与核周隙相沟通，而且外核膜有时也附着大量的核糖体。这种结构上的联系

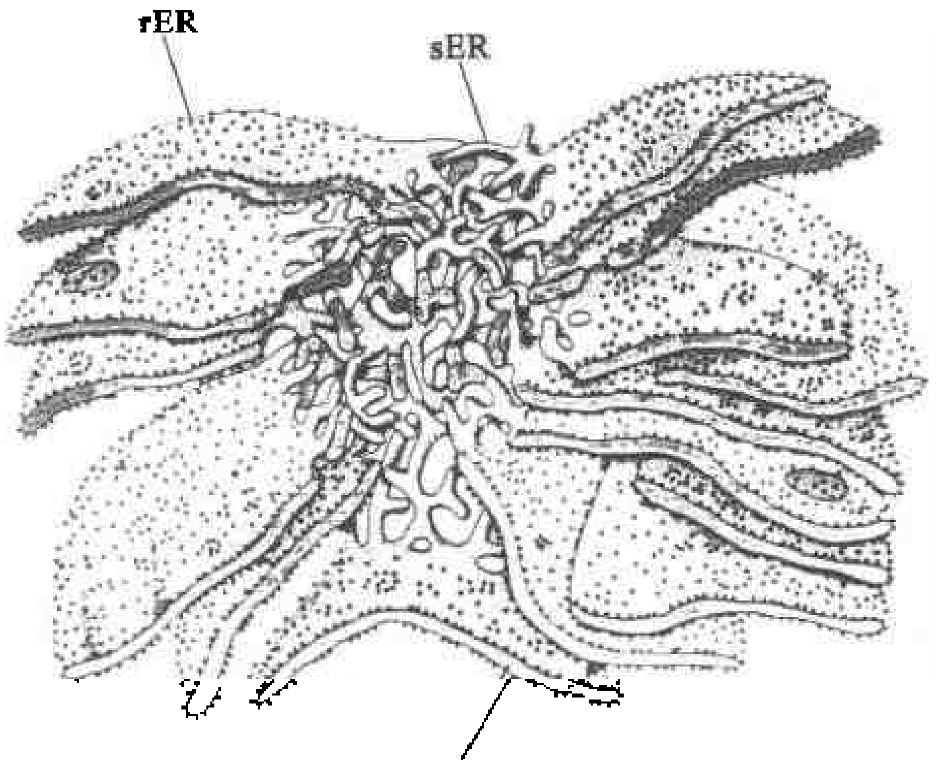


图 6-5 根据对肝细胞连续超薄切片观察的结果，绘制出部分光面内质网与糙面内质网立体结构图
（引自 Albert *et al*.，1989）

不仅反映了核－质间的物质交换，同时也提出了内质网与核膜在发生上的同源关系。

光面内质网与高尔基体在结构、功能与发生上的关系更为密切。此外，在合成旺盛的细胞内，糙面内质网总是与线粒体紧密相依。过去的解释认为线粒体是内质网执行功能时所需能量的直接“供应站”。最近发现脂质的相互交换及 Ca^{2+} 释放的调节都与之密切相关。在间期细胞中，内质网的分布常常与微管的走向一致，且总是沿微管向细胞周缘延伸。已发现一种微管马达蛋白——驱动蛋白（kinesin）与内质网结合，推测既然内质网一端固定在核膜上，另一端则可能在驱动蛋白的牵引下沿微管向外延伸形成复杂的网状结构。

内质网对外界因素的作用（如射线、化学毒物、病毒等）非常敏感，糙面内质网发生的最普遍的病理变化是内质网腔扩大并形成空泡，继而核糖体从内质网膜上脱落，蛋白质合成受阻。

二、内质网的功能

内质网是细胞内蛋白质与脂质合成的基地，几乎全部的脂质和多种重要的蛋白质都是在内质网上合成的。目前对内质网的功能尚不完全了解，对其中很多细节知之甚少。就已积累的材料可以看出，内质网是行使多种重要功能的复杂的结构体系。

1. 蛋白质的合成

细胞中的蛋白质都是在核糖体上合成的，并都是起始于细胞质基质之中。有些蛋白质刚起始合成不久便转移至内质网膜上，继续进行蛋白质合成。在糙

面内质网上，多肽链一边延伸一边穿过内质网膜进入内质网腔中，以这类方式合成的蛋白质主要包括：

(1) 向细胞外分泌的蛋白质

向细胞外分泌的蛋白，如胰腺细胞分泌的酶、浆细胞分泌的抗体、小肠杯状细胞分泌的粘蛋白(mucin)、内分泌腺分泌的多肽类激素以及胞外基质成分等。这类蛋白质常以分泌泡的形式通过细胞的胞吐作用输送到细胞外，而且这种蛋白运输的方式也利于分泌过程的调控。

(2) 膜的整合蛋白

细胞膜上的膜蛋白及内质网、高尔基体和溶酶体膜上的膜蛋白等都具有方向性，其方向性在内质网上合成时就已确定，在以后的转运过程中，其拓扑学特性始终保持不变。

(3) 构成细胞器中的可溶性驻留蛋白

有些驻留蛋白需要与其他细胞组分严格隔离，如溶酶体与植物液泡中的酸性水解酶类；内质网、高尔基体和胞内体(endosome)中固有的蛋白以及其他有重要生物活性的蛋白，在合成后进入内质网，便于与其他细胞组分进一步区分，也有利于对它们的加工与活化。

另外，有些蛋白质在合成后需要进行修饰与加工，这是由内质网及高尔基体中一系列酶来完成的。细胞质基质中合成的蛋白质与内质网上合成的蛋白质各具有自己的特点，内质网则为这些蛋白质准确有效地到达目的地提供了必要的条件。

2. 脂质的合成

内质网合成构成细胞所需要的包括磷脂和胆固醇在内的几乎全部的膜脂，其中最主要的磷脂是磷脂酰胆碱(卵磷脂)。合成磷脂所需要的 3 种酶都定位在内质网膜上，其活性部位在膜的细胞质基质一侧(图 6－6)。合成磷脂的底物是来自细胞质基质，反应的第一步是增大膜面积；第二、三两步确定新合成磷脂的种类。除磷脂酰胆碱外，其他几种磷脂，如磷脂酰乙醇氨、磷脂酰丝氨酸以及磷脂酰肌醇等都以类似的方式合成。

在内质网膜上合成的磷脂几分钟后就由细胞质基质侧转向内质网腔面，其转位速度比自然转位速度高 10^5 倍，可能是借助一种磷脂转位因子(phospholipid translocator)或称转位酶(flippase)的帮助来完成的。这种因子对含胆碱的磷脂要比对含丝氨酸、乙醇胺和肌醇的磷脂转位能力强，因此磷脂酰胆碱更容易转到内质网膜的腔面。

合成的磷脂由内质网向其他膜的转运主要有两种方式：一种是以出芽的方式转运到高尔基体、溶酶体和细胞膜上；另一种方式是凭借一种水溶性的载体蛋白，称为磷脂转换蛋白(phospholipid exchange proteins，PEP)在膜之间转移磷脂。其转运模式是，首先 PEP 与磷脂分子结合形成水溶性的复合物进入细胞质基质，通过自由扩散，直至遇到靶膜时，PEP 将磷脂释放出来，并安插在膜上，结果是磷脂从含量高的膜转移到缺少磷脂的膜上，即从磷脂合成部位转移到线粒体

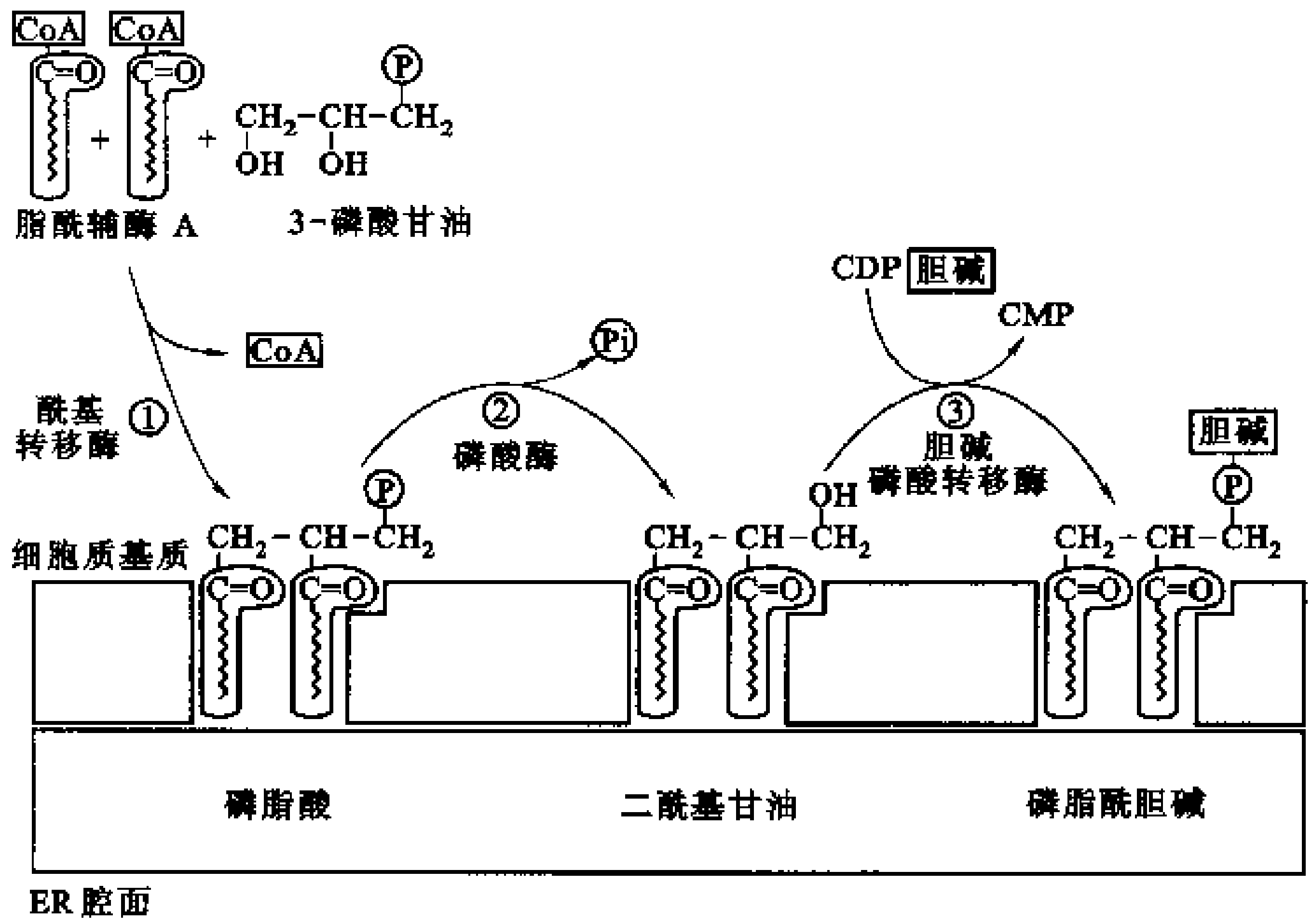


图 6-6 磷脂酰胆碱在内质网膜上合成过程的示意图(引自 Alberts *et al.*, 1994)

或过氧化物酶体膜上。可能线粒体和过氧化物酶体是唯一缺少磷脂的细胞器。每种 PEP 只能识别一种磷脂,推测磷脂酰丝氨酸就是以这种方式转移到线粒体膜上,然后脱羧基而产生磷脂酰乙醇胺,而磷脂酰胆碱则不加任何修饰地转移到线粒体膜上。

3. 蛋白质的修饰与加工

进入内质网中的蛋白质发生的主要化学修饰作用有糖基化、羟基化、酰基化与二硫键的形成等。糖基化伴随着多肽合成同时进行,是内质网中最常见的蛋白质修饰。在内质网腔面,寡糖链连接在插入膜内的磷酸多萜醇上,当与糖基化有关的氨基酸残基出现后,通过在膜上的糖基转移酶(glycosyltranferase)的作用,将寡糖基由磷酸多萜醇转移到相应的天冬酰胺残基上(图 6-7)。

寡糖基转移到天冬酰胺残基上称为 *N*-连接的糖基化(*N*-linked glycosylation),与天冬酰胺直接结合的糖都是 *N*-乙酰葡萄糖胺。寡糖链具有共同的内核结构。也有少数糖基化是发生在丝氨酸或苏氨酸残基上,称 *O*-连接的糖基化(*O*-linked glycosylation),后者也可能发生在羟赖氨酸或羟脯氨酸上(如胶原蛋白),与之直接结合的糖是 *N*-乙酰半乳糖胺。*O*-连接的糖基化主要发生在高尔基体中,其过程尚不完全了解。内质网腔中的蛋白质的寡糖链在进入高尔基体及整个转移过程中,还会经过一系列复杂的修饰。在细胞质基质中只发现少数几种糖蛋白,其糖基化修饰非常简单。酰基化发生在内质网的胞质侧,通常是软脂酸共价结合在跨膜蛋白的半胱氨酸残基上,类似的酰基化也发生在高尔基体甚至膜蛋白向细胞膜转移的过程中。

4. 新生多肽的折叠与装配

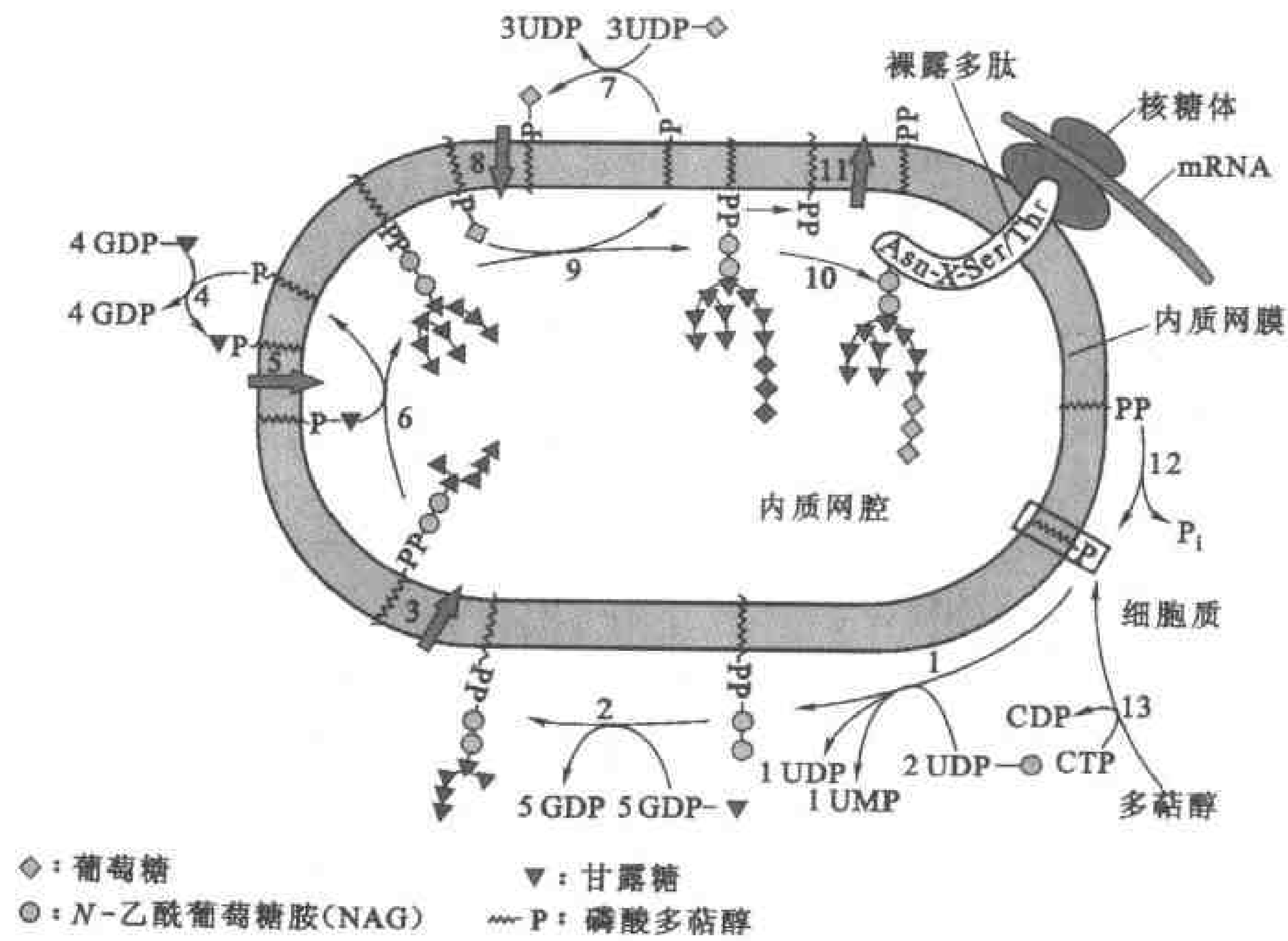


图 6－7　糙面内质网上 N－连接寡糖的合成过程(反应 1－12)

(引自 D. Voet *et al*.,1995)

在糖基转移酶的催化下,寡糖基从磷酸多萜醇载体转移到肽链的天冬酰胺残基上(反应 10)

肽链的合成仅需要几十秒钟至几分钟,而新合成的多肽在内质网停留的时间往往长达几十分钟。不同的蛋白质在内质网停留的时间长短不一,这在很大程度上取决于合成蛋白正确折叠所需要的时间。有些多肽还要进一步装配成寡聚体。不能正确折叠的畸形肽链或未装配成寡聚体的蛋白质亚单位,不论在内质网膜上还是在内质网腔中,一般都不能进入高尔基体。这类多肽一旦被识别,便通过 Sec61p 复合体从内质网腔转至细胞质基质,进而被蛋白酶体所降解。它们的半寿期约为 20～30 min,有些只有 5 min。

在内质网狭小的腔隙中常常同时有多种蛋白质大量合成。多肽链疏水基团之间的相互作用,侧链基团之间的相互作用,尤其是内质网腔是一种非还原性的环境,极易形成二硫键,这些都对肽链的正确折叠带来了很大困难。内质网中有一种蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase),它附着在内质网膜腔面上,可以切断二硫键,形成自由能最低的蛋白构象,以帮助新合成的蛋白重新形成二硫键并处于正确折叠的状态。没有这种酶,新合成的蛋白也可以正确折叠,但它的存在大大加快了这一过程。

折叠好的蛋白质,内部往往有个疏水的核心,未折叠的蛋白质由于疏水核心的外露,即使在很低的浓度下,也很容易发生聚集,甚至与其他未折叠的蛋白形成复合物。内质网含有一种结合蛋白(binding protein,Bip),可以识别不正确折叠的蛋白或未装配好的蛋白亚单位,并促进它们重新折叠与装配。一旦这些蛋

白形成正确构象或装配完成，便与 Bip 分离，进入高尔基体。蛋白二硫键异构酶和 Bip 等蛋白都具有 4 肽信号（KDEL 或 HDEL）以保证它们滞留在内质网中，并维持很高的浓度。Bip 还可同 Ca^{2+} 结合，可能通过 Ca^{2+} 与带负电的磷脂头部基团相互作用，使 Bip 结合到内质网膜上。最近证明 Bip 属于热休克蛋白 70 家族的新成员，遍布在细胞内质网中。它们在进化上非常保守。

5．内质网的其他功能

一般情况下，光面内质网所占比例很小，但在某些细胞中非常发达。肝细胞中的光面内质网很丰富，它是合成外输性脂蛋白颗粒的基地。肝细胞中的光面内质网中还含有一些酶，用以清除脂溶性的废物和代谢产生的有害物质，因而光面内质网具有解毒功能。其中研究较为深入的是细胞色素 P450 家族酶系的解毒反应过程，是使聚集在光面内质网膜上的不溶于水的废物或代谢产物羟基化而完全溶于水并转送出细胞进入尿液中。某些药物如苯巴比妥（phenobarbitol）进入体内，肝细胞中与解毒反应有关的酶便大量合成，几天之中光面内质网的面积成倍增加。一旦毒物消失，多余的光面内质网也随之被溶酶体消化，5 天内又恢复到原来的大小。

在某些合成固醇类激素的细胞如睾丸间质细胞中，光面内质网也非常丰富，其中含有制造胆固醇并进一步产生固醇类激素的一系列的酶。

肌细胞中含有发达的特化的光面内质网，称肌质网（sarcoplasmic reticulum）。肌质网膜上的 Ca^{2+} - ATP 酶将细胞质基质中的 Ca^{2+} 泵入肌质网腔中，储存起来。当受到神经冲动刺激后，Ca^{2+} 释放出来，肌肉收缩。在多数真核细胞中，细胞外的信号物质也可引起 Ca^{2+} 向细胞质基质中释放。内质网具有储存 Ca^{2+} 的功能，在内质网膜上也存在与肌细胞的肌质网膜上相同的三磷酸肌醇（IP_3）的受体。此外，在内质网中至少发现包括 Bip 在内的 4 种以上的钙结合蛋白，其中一种与肌质网中的钙结合蛋白相同。每个钙结合蛋白的分子可与 30 个左右的 Ca^{2+} 结合，因为内质网腔中钙结合蛋白的浓度可达 30～100 mg/ml，从而使内质网中的 Ca^{2+} 浓度高达 3 mmol/L。内质网不仅作为 Ca^{2+} 的储存库，而且由于高浓度的 Ca^{2+} 及与之结合的钙结合蛋白的存在，可能阻止内质网以出芽的方式形成运输小泡。因此 Ca^{2+} 浓度的变化对运输小泡的形成，可能起重要的调节作用。

除此之外，内质网还为细胞质基质中很多蛋白，包括多种酶类，提供了附着位点。有人认为内质网的扁囊和管道还有储存与运输物质的功能，在能量与信息的传递、细胞的支持和运动等方面可能也具有一定的作用。

三、内质网与基因表达的调控

内质网蛋白主要在糙面内质网上合成，也有一部分是在细胞质基质中合成后转入内质网中。大量多种蛋白需要在内质网中折叠、装配、加工、包装及向高尔基体转运。这一过程显然是需要有一个精确调控的过程。最近人们发现至少

有三种不同的内质网—细胞核的信号转导途径，其中涉及到一系列信号转导分子最终调节细胞核内特异基因的表达：

1. 内质网腔内未折叠蛋白的超量积累。

2. 折叠好的膜蛋白的超量积累。

3. 内质网膜上膜脂成分的变化——主要是固醇缺乏。这些变化将通过不同的信号转导途径诱导不同的基因活化，最终细胞表现出相应的对策，如启动未活化固醇合成相关的基因等，以保证内质网正常行使其功能。

第三节　高尔基复合体

高尔基体(Golgi body)又称高尔基器(Golgi apparatus)或高尔基复合体(Golgi complex)，是比较普遍地存在于真核细胞内的一种细胞器。1898 年，意大利医生 Camillo Golgi 用镀银法首次在神经细胞内观察到一种网状结构，命名为内网器(internal reticular apparatus)。后来在很多细胞中相继发现了类似的结构并称之为高尔基体。高尔基体从发现至今已有百年历史，其中一半以上的时间是进行关于高尔基体的形态甚至是它是否真实存在的争论。细胞学家赋予它十几种不同的名称，也有很多人认为高尔基体是由于固定和染色而产生的人工假象。20 世纪 50 年代以后随着电子显微镜技术的应用和超薄切片技术的发展，才证实了高尔基体的存在。它不仅存在于动植物细胞中，而且也存在于原生动物和真菌细胞内。

人们花费了半个世纪的时间才确认高尔基体的存在，这不仅是由于当时主要研究手段——光学显微镜的局限性，而且也反映了高尔基体的自身结构特征。高尔基体是由大小不一、形态多变的囊泡体系组成，在不同的细胞中，甚至细胞生长的不同阶段都有很大的区别。有时不易辨认，而且更难分离与纯化，再加上一般动物细胞中数目较少，在含量丰富的肝细胞中也仅有少量的高尔基体。因此对高尔基体的结构与功能的研究，一直是细胞生物学家面临的挑战性难题之一。经过了较长时间的描述性工作以后，近些年来已开始对维持高尔基体的结构与行使其功能的分子机制进行了研究，目前积累的资料虽然远远不足以彻底阐明高尔基体的结构与功能，但是却使我们对高尔基体这一难以捉摸的细胞器的认识提高到了前所未有的高度。

一、高尔基体的形态结构

电子显微镜所观察到的高尔基体最富有特征的结构是由一些(常常 4～8 个)排列较为整齐的扁平膜囊(saccules)堆叠在一起，构成了高尔基体的主体结构(图 6－8)。扁囊多呈弓形，也有的呈半球形或球形。膜囊周围又有大量的大小不等的囊泡结构。扁囊的直径多在 1μm 左右，中间囊腔较窄，周缘多呈泡状，每层扁囊之间的距离约 15～30 nm。在不同细胞中扁囊的数目差异很大，少至

1～2个，多至十几个。高尔基体是一种有极性的细胞器，这不仅表现在它在细胞中往往有比较恒定的位置与方向，而且物质从高尔基体的一侧进入，从另一侧输出，因此每层膜囊也各不相同。在很多细胞中，高尔基体靠近细胞核的一面，扁囊弯曲成凸面又称形成面(forming face)或顺面(cis face)，面向细胞膜的一面常呈凹面(concave)又称成熟面(mature face)或反面(trans face)。

根据高尔基体的各部分膜囊特有的成分，可用电镜细胞化学的方法对高尔基体的结构成分作进一步的分析。常用的4种标志细胞化学反应是：

(1) 嗜锇反应，经锇酸浸染后，高尔基体的cis面膜囊被特异地染色。

(2) 焦磷酸硫胺素酶(TPP酶)的细胞化学反应，可特异地显示高尔基体的trans面的1～2层膜囊。

(3) 胞嘧啶单核苷酸酶(CMP酶)的细胞化学反应，常常可显示靠近trans面上的一些膜囊状和管状结构，CMP酶也是溶酶体的标志酶。20世纪60年代初，Novikoff发现CMP和酸性磷酸酶存在于高尔基体的一侧，称这种结构为GERL，意为这种结构与高尔基体(G)密切相关，但它是内质网(ER)的一部分，参与溶酶体(L)的生成。当时认为溶酶体中的酶是内质网合成后，通过GERL而不经过高尔基体进入溶酶体中的。这一假说影响达十年之久。

(4) 烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸酶(NADP酶)的细胞化学反应，是高尔基体中间几层扁平囊的标志反应。

高尔基体的各种标志反应不仅有助于对高尔基体结构与功能的深入了解，而且可以用来更准确地鉴别高尔基体的极性。如汤雪明等用嗜锇反应作为高尔基体顺面的标志反应，研究了嗜中性颗粒细胞发育过程中高尔基体的极性变化。结果表明，高尔基体的顺面并非总是在高尔基体的凸面，在细胞发育的某个阶段可能位于高尔基体的凹面。在此以前，由于仅根据形态上的凸凹来确定高尔基体的极性，因此一度认为嗜中性颗粒细胞的中幼粒细胞阶段，其高尔基体的顺面也具有输出分泌颗粒的功能。

Rambourg等借助超高压电镜技术观察不同厚度的切片，并从不同角度拍摄高尔基体的立体照片，对高尔基体的形态结构进行了比较与系统的三维结构分析，结果显示高尔基体是一个十分复杂的连续的整体结构。对酵母细胞中高尔基体功能缺陷突变株的研究结果，证实了高尔基体是一个复杂的由许多功能不同的间隔所组成的完整体系。目前多数学者认为，高尔基体至少由互相联系的4个部分组成，每一部分又可能划分出更精细的间隔(图6－8)。

1. 高尔基体顺面膜囊(cis Golgi)或顺面网状结构(cis Golgi network，CGN)

位于高尔基体顺面最外侧的扁平膜囊，又称cis膜囊，是中间多孔而呈连续分支状的管网结构。CGN膜厚约6 nm，比高尔基体其他部位略薄，但与内质网膜厚度接近。一般认为，CGN接受来自内质网新合成的物质并将其分类后大部分转入高尔基体中间膜囊，小部分蛋白质与脂质再返回内质网。返回内质网的蛋白质具有KDEL(或HDEL)这一信号序列，它是驻留在内质网内蛋白的特有序列。CGN区域还可能具有其他生物活性，如蛋白丝氨酸残基发生O－连接的

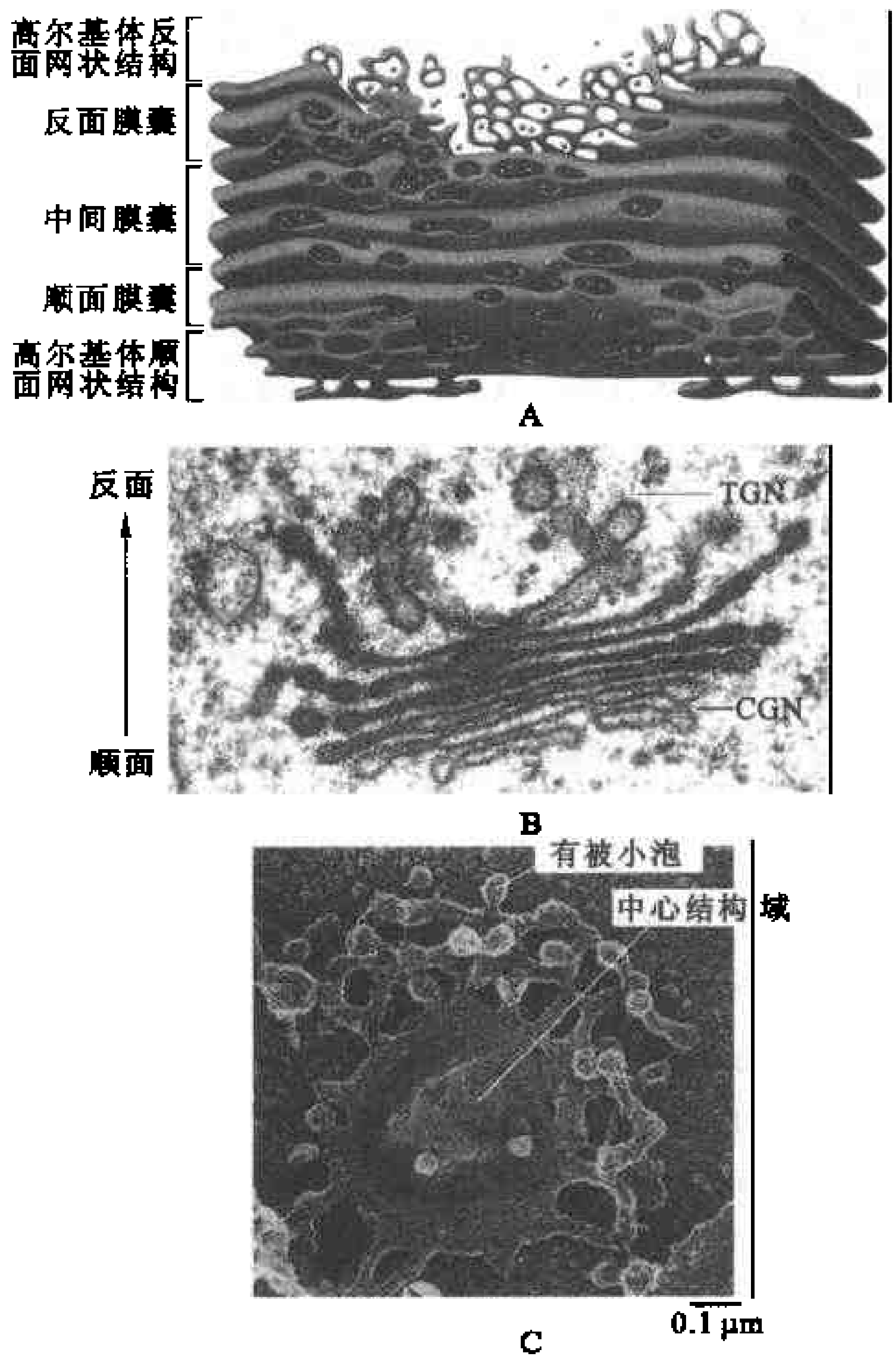


图 6-8 高尔基体(引自 G.Karp,1999)

A:高尔基体的分区示意图; B:电镜下烟草根冠细胞的高尔基体;

C:单个高尔基囊泡的电镜照片,包括凹陷的中心结构域和外围结构域

糖基化;跨膜蛋白在细胞质基质一侧结构域的酰基化;日冕病毒的装配也发生在CGN上。

2. 高尔基体中间膜囊(medial Golgi)

由扁平膜囊与管道组成,形成不同间隔,但功能上是连续的、完整的膜囊体系。多数糖基化修饰、糖脂的形成以及与高尔基体有关的多糖的合成都发生在中间膜囊中。扁平膜囊特殊的形态使其具有很大的膜表面,从而大大增加了进行糖的合成与修饰的有效面积。

3. 高尔基体反面的膜囊(trans Golgi)以及反面高尔基体网状结构(trans Golgi network,TGN)

TGN 位于反面的最外层,与反面的扁平膜囊相连,另一侧伸入反面的细胞质中,形态呈管网状,并有囊泡与之相连。在不同的细胞中,TGN 的形态结构有

很大的区别，其细胞化学特征也有所差异。TGN 中的 pH 可能比高尔基体其他部位低。经 C_6-NBP-ceramide 或 C_5-DMB-ceramide 标记后可在电镜下观察到 TGN。在某些细胞中溶酶体的标志酶 CMP 酶也可以显示 TGN，因此一些学者认为，呈 CMP 阳性反应的 TGN 就是 GERL 区域。

TGN 的主要功能是参与蛋白质的分类与包装，最后从高尔基体中输出，某些"晚期"的蛋白质修饰也发生在 TGN 中，如半乳糖(α)2,6 位的唾液酸化、蛋白质酪氨酸残基的硫酸化及蛋白原的水解加工作用等。有人认为 TGN 在蛋白质与脂质的转运过程中还起到"瓣膜"的作用，保证这些物质向单方向转运。与高尔基体的其他结构相比，TGN 的形态更是处于不断的动态变化之中。

在高尔基体的周围常常有大小不等的囊泡。顺面一侧的囊泡可能是内质网与高尔基体之间的物质运输小泡，称之为 ERGIC(endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment)，或称 VTCs(Vesicular-tubular clusters)。已知其唯一标志蛋白 p53 及其在小鼠中的同源蛋白 p58。因此又称 ERGIC53/58 蛋白，ERGIC53/58 具有与甘露糖结合的特性，推测它可能是一种在分泌途径早期起分选作用的凝集素。在高尔基体的反面一侧可以见到体积较大的分泌泡与分泌颗粒，将经过高尔基体分类与包装的物质运送到细胞特定的部位。

三维形态研究表明，高尔基体各个膜囊之间均由膜性结构连在一起，它们在高尔基体内的物质运输中所起的作用尚不清楚。高尔基体周围另一些囊泡推测是膜囊周缘膨大部分出芽形成的，它们可能负责膜囊之间的物质运输。高尔基体与细胞骨架关系十分密切，在没有极性的细胞中，高尔基体分布在微管的负端——微管组织中心处，且分离的高尔基体的膜囊上，既存在微管的马达蛋白细胞质臂动蛋白(cytoplasmic dynein)和动力蛋白(kinesin)，又存在微丝的马达蛋白几种肌球蛋白(myosin)。最近还发现特异的血影蛋白(spectrin)网架也存在于高尔基体处。显然，它们在维持高尔基体动态的空间结构以及复杂的膜泡运输中起重要的作用。

二、高尔基体的功能

高尔基体的主要功能是将内质网合成的多种蛋白质进行加工、分类与包装，然后分门别类地运送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。内质网上合成的脂质一部分也要通过高尔基体向细胞膜和溶酶体膜等部位运输，因此可以说，高尔基体是细胞内大分子运输的一个主要交通枢纽。此外高尔基体还是细胞内糖类合成的工厂，在细胞生命活动中起多种重要的作用。

1. 高尔基体与细胞的分泌活动

虽然早期的形态学观察结果就提示了高尔基体可能与细胞分泌活动有关，但对这一功能的了解却经历了一个较长的逐渐认识的过程。

20 世纪 70 年代初，Caro 用 ^3H－亮氨酸对胰腺的腺泡细胞进行脉冲标记，发现在脉冲标记 3 min 后，放射自显影银粒主要位于内质网；20 min 后，银粒出现

在高尔基体;120 min 后则位于分泌泡并开始在顶端释放。实验显示了分泌性蛋白在细胞内的合成与转运途径,其转运的过程是通过高尔基体来完成的,后来的研究进一步表明,除分泌性蛋白外,很多细胞膜上的膜蛋白、溶酶体中的酸性水解酶及胶原纤维等胞外基质成分都是通过高尔基体完成其定向转运过程。

作为蛋白质合成主要场所的内质网常常同时合成多种蛋白质,那么高尔基体怎样完成对这些蛋白质的分类与转运功能呢?

20 世纪 60 年代,人们发现溶酶体中所有的酶都有共同的标志。70 年代证明这一共同标志就是 6 - 磷酸甘露糖(M6P),80 年代纯化了与这一反应有关的酶及 M6P 受体,从而把溶酶体酶在高尔基体中的分选过程作为了解高尔基体功能的一个重要例子。

溶酶体中含有几十种酸性水解酶类,它们在内质网上合成后进入高尔基体。在内质网上合成时发生了 *N* - 连接的糖基化修饰,即把一个寡糖链共价结合到溶酶体酶分子中的天冬酰氨残基上。在高尔基体的顺面膜囊中存在 *N* - 乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶和 *N* - 乙酰葡萄糖胺磷酸糖苷酶,在这两种酶的催化作用下,寡糖链中的甘露糖残基磷酸化产生 6 - 磷酸甘露糖。这种特异的反应,只发生在溶酶体的酶上,而不发生在其他的糖蛋白上。估计溶酶体酶本身的构象含有某种磷酸化的信号,如改变其构象则不能被识别也就不能形成 6 - 磷酸甘露糖。在高尔基体反面的膜囊上结合着 6 - 磷酸甘露糖的受体,由于溶酶体酶的许多位点上都可形成 6 - 磷酸甘露糖,从而大大增加了与受体的亲和力。这种特异的亲和力使溶酶体的酶与其他蛋白质分离并起到局部浓缩的作用。有一种称为 I 细胞(inclusion cell)的疾病,病人由于 *N* - 乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶单基因的缺损,因此不能合成 6 - 磷酸甘露糖,溶酶体的酶也就不能被受体识别,因而无法转运到溶酶体中。

在内质网合成的蛋白质很多都是糖蛋白,而且这些蛋白质的糖链要在高尔基体中经历十分复杂的修饰。于是人们猜测这种修饰作用可能与蛋白质在高尔基体中的分选有关。然而用 DNA 重组技术证明,多种糖蛋白在去掉糖链后仍能正常地输送到细胞的特定部位,说明糖链在多数蛋白质的分选中并不起决定性的作用。上述溶酶体酶的分选途径可能仅仅是一个特例,况且也不是溶酶体酶唯一的途径。已发现在肝细胞中溶酶体酶还存在不依赖于 6 - 磷酸甘露糖的另一种分选途径。

一个很有趣的实验显示了蛋白质在高尔基体中分选及其转运的信息仅存在于编码这个蛋白质的基因本身。流感病毒和水泡性口炎病毒可同时感染上皮细胞,这两种有包膜病毒的包膜蛋白均在内质网上合成,然后经高尔基体转运到细胞膜上。流感病毒的包膜蛋白特异性地转运到上皮细胞游离端的细胞膜上,而水泡性口炎病毒的包膜蛋白则转运到基底面的细胞膜上。将克隆的流感病毒包膜蛋白的基因和水泡性口炎病毒包膜蛋白的基因同时在上皮细胞中表达,结果显示,两种病毒包膜蛋白的合成、转运途径及在细胞膜上的分布与两种病毒同时感染细胞时,病毒包膜蛋白在细胞膜上的分布相同。

目前,人们发现水泡性口炎病毒包膜蛋白在由内质网合成后进入高尔基体时,存在于细胞质基质一侧的双酸分选信号(Asp-x-Gln 或 DxE)起重要的作用,其他一些膜蛋白也具有这一信号序列,表明膜蛋白在由内质网向高尔基体转运时,也存在一种选择性的转运机制。但是关于高尔基体对各种蛋白自身所携带的分选信号的识别,进而对其分类、包装与运送的机制,目前还不很清楚。高尔基体对蛋白转运的调控机制目前也了解甚少。然而,一些实验显示一类小分子的 G 蛋白(GTP binding regulatory protein or G protein)Rab 在高尔基体的囊泡转运中起重要调节作用。

2. 蛋白质的糖基化及其修饰

溶酶体中的水解酶类、多数细胞膜上的膜蛋白和分泌蛋白都是糖蛋白,而在细胞质基质和细胞核中绝大多数蛋白质都无糖基化修饰。仅有的例外是某些转录因子和核孔复合体上发现一些糖蛋白,结合在蛋白质上的糖基也比较简单。这就是说,糙面内质网上合成的大多数蛋白质在内质网和高尔基体中发生了糖基化。不仅如此,在从内质网向高尔基体及在高尔基体各膜囊之间的转运过程中,连接在蛋白侧链上的寡糖基会发生一系列有序的加工与修饰。

与细胞内其他生物大分子如 DNA、RNA 和蛋白质合成(它们都具有一个模板,使用相同的一套酶系并以类似的重复过程进行合成)不同,糖蛋白中寡糖链的合成与加工都没有模板,靠不同的酶而且在细胞的不同间隔中经历复杂的加工过程才能完成。因此人们推测,真核细胞中普遍存在的糖基化一定具有某种重要的功能。首先考虑到的就是为各种蛋白质打上不同的标志,以利于高尔基体的分类与包装,同时保证糖蛋白从糙面内质网至高尔基体膜囊单方向进行转移。糖基化的另一种功能是影响多肽的构象。用抗生素 tunicamycin 阻断蛋白质糖基化,糙面内质网中合成的多肽,如分泌蛋白 IgG 抗体或分送到质膜上的糖蛋白如血凝素等,由于缺少糖基侧链不能正确折叠而滞留在内质网中。

然而很多糖蛋白的分选与行使其功能并非需要糖基化的修饰,如在成纤维细胞中,它所分泌的纤连蛋白(FN)的数量与速率不受蛋白质糖基化与否的影响,但是糖基化的 FN 比未糖基化的 FN 对组织蛋白酶有更强的抗性,提示糖基化增强了糖蛋白的稳定性。此外,多羟基糖侧链还可能影响蛋白质的水溶性及蛋白质所带电荷的性质,如哺乳动物细胞表面常常带有负电荷,显然与很多膜蛋白糖侧链上的唾液酸残基的存在有关。目前对蛋白质糖基化生物学意义的了解还不够深入,从已有的研究结果可以看出,不同的蛋白质糖基化具有不同的功能。对多数由高尔基体分选的蛋白质来说,糖基化并非作为蛋白质的分选信号,而更主要的作用可能是蛋白质在成熟过程中折叠成正确的构象和增加蛋白质的稳定性。但这样仍很难解释糖侧链在内质网,特别是在高尔基体中的如此复杂的加工过程。有些学者从进化的角度上提出,因为寡糖链具有一定的刚性,从而限制了其他大分子接近细胞表面的膜蛋白,这就可能使真核细胞的祖先具有一个保护性的外被,同时又不像细胞壁那样限制细胞的形状与运动。这可能是在进化过程中逐步演化产生的。

真核细胞中寡糖链一般结合在肽链的 4 种氨基酸残基上，由此可分成两大类不同的糖基化修饰，即 N - 连接（连接到天冬酰胺的酰胺氮原子上）和 O - 连接（连接到丝氨酸、苏氨酸或在胶原纤维中的羟赖氨酸或羟脯氨酸的羟基上）糖基化。N - 连接与 O - 连接的寡糖在成分和结构上有很大的不同，合成与加工的方式也完全不同（表 6 - 2）。

表 6 - 2　N - 连接与 O - 连接的寡糖比较

特　征	N - 连接	O 连接
合成部位	糙面内质网	糙面内质网或高尔基体
合成方式	来自同一个寡糖前体	一个个单糖加上去
与之结合的氨基酸残基	天冬酰胺	丝氨酸、苏氨酸、羟赖氨酸、羟脯氨酸
最终长度	至少 5 个糖残基	一般 1 ~ 4 个糖残基，但 ABO 血型抗原较长
第一个糖残基	N - 乙酰葡萄糖胺	N - 乙酰半乳糖胺等

在内质网一节已提到 N - 连接的糖基化反应发生在糙面内质网中，一个由 14 个糖残基的寡糖链从供体磷酸多萜醇上转移至新生肽链的特定三肽序列的天冬酰胺残基上（Asn - X - Ser 或 Asn - X - Thr，其中 X 是除 Pro 以外的任何氨基酸）。因此所有的 N 连接的寡糖链都有一个共同的前体，在糙面内质网内以及在通过高尔基体各间隔转移的过程中，寡糖链经过一系列酶的加工，切除和添加特定的单糖，最后形成成熟的糖蛋白。所有成熟的 N - 连接的寡糖链都含有 2 个 N - 乙酰葡萄糖胺和 3 个甘露糖残基。根据其结构特征又可分为高甘露糖 N - 连接寡糖（high mannose N - linked oligosaccharide）和复杂的 N - 连接寡糖（complex N - linked oligosaccharide），前者只含有 N - 乙酰葡萄糖和甘露糖，后者除此之外还含有岩藻糖、半乳糖和唾液酸，二者可能分别存在于不同种类的糖蛋白中，也可能存在于同一条肽链的不同位点上。

O - 连接的糖基化是在内质网或高尔基体中进行的。随后由于不同的糖基转移酶催化，每次加上一个单糖。同复杂的 N - 连接的糖基化一样，最后一步是加上唾液酸残基，这一反应发生在高尔基体反面膜囊和 TGN 中，至此完成全部糖基的加工与修饰。多数的糖蛋白在 10 min 内便可从高尔基体转送到其目的地。

内质网和高尔基体中所有与糖基化及寡糖的加工有关的酶都是整合膜蛋白。它们固定在细胞的不同间隔中，其活性部位均位于内质网或高尔基体的腔面。在高尔基体中，其反应底物——核苷酸单糖（nucleotide sugar）通过载体蛋白介导的对向协同运输的方式从细胞质基质转运到高尔基体囊腔内。在不同的间隔中，膜上的载体蛋白也有所不同，以维持腔内特定反应底物的浓度。

用电镜放射自显影的方法或不同的寡糖链合成的抑制剂，可显示在内质网和高尔基体各间隔中寡糖合成的活性。如用 ^{3}H - 甘露糖进行脉冲标记，标记物集中在糙面内质网上，用 ^{3}H - 岩藻糖或 ^{3}H - 半乳糖标记，则标记物集中在高尔基体的反面膜囊中。进一步分析证明半乳糖苷转移酶位于高尔基体反面膜囊

中,唾液酸转移酶存在于高尔基体反面膜囊和 TGN 中。因此寡糖链的合成与加工非常像在一条装配流水线上,糖蛋白从细胞器的一个间隔输送到另一个间隔,固定在间隔内壁上的一套排列有序的酶系,依次进行一道道加工,前一个反应的产物又作为下一个反应的底物,确保只有加工过的底物才能进入下一道工序(图 6-9)。

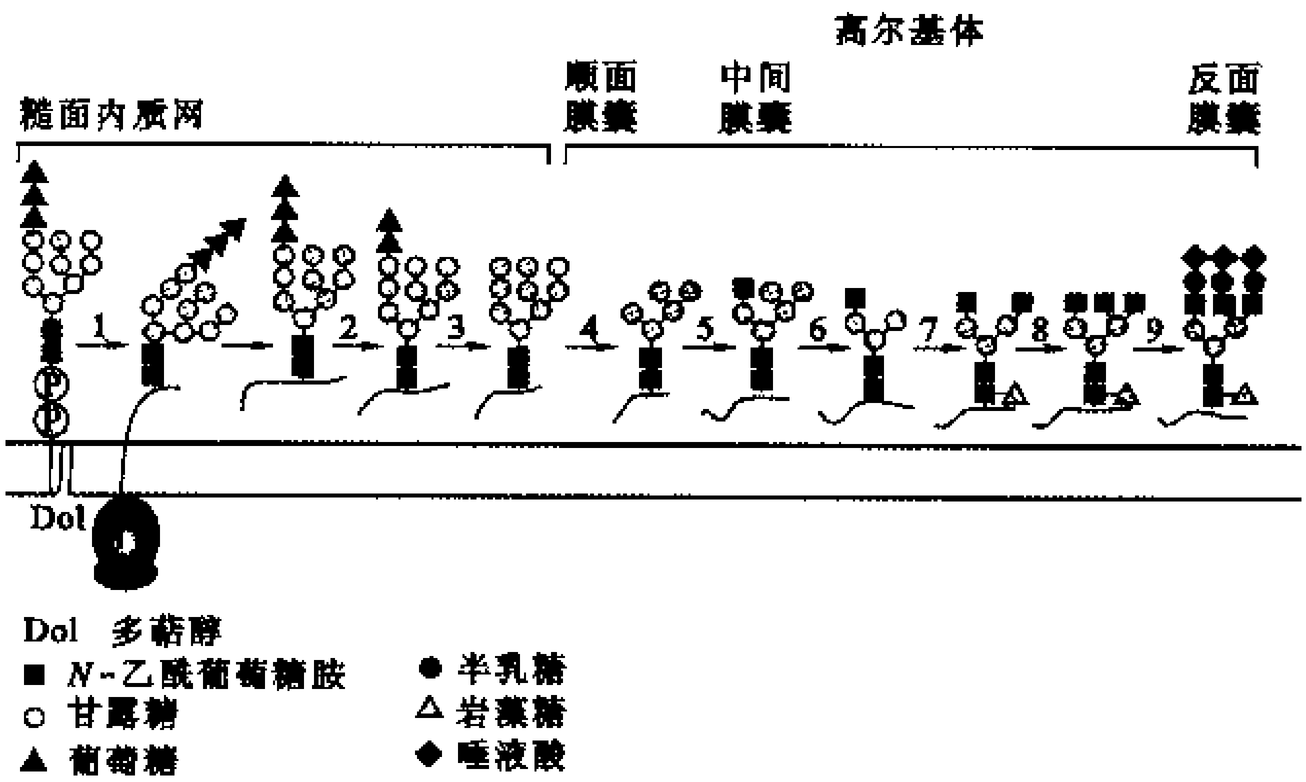


图 6-9　复杂的 N-连接寡糖在内质网和高尔基体中的加工过程中,至少有 11 种以上的酶参与(引自 Albert *et al*.,1989)

细胞中还有一类重要的糖蛋白,即蛋白聚糖(proteoglycan),也在高尔基体中装配。它是由一个或多个糖胺聚糖(glycosaminoglycans)结合到核心蛋白的丝氨酸残基上。与一般 O-连接寡糖不同,它直接与丝氨酸羟基结合的不是 N-乙酰半乳糖胺而是木糖(xylose)。蛋白聚糖多为胞外基质的成分,有些也整合在细胞膜上,很多上皮细胞分泌的保护性粘液常常是蛋白聚糖和高度糖基化的糖蛋白的混合物。

在植物细胞中,高尔基体合成和分泌多种多糖,它们至少含 12 种以上的单糖。多数多糖呈分支状且有很多共价修饰,远比动物细胞的复杂。估计构成植物细胞典型初生壁的过程就涉及数百种酶。除少数酶共价结合在细胞壁上外,多数酶都存在于内质网和高尔基体中。其中一个例外是多数植物细胞的纤维素是由细胞膜外侧的纤维素合成酶合成的。对糖脂研究的资料不多,但已有的证据表明,糖脂的糖侧链也是以与糖蛋白相同的途径和方式合成与加工的,最后由高尔基体转运到溶酶体膜或细胞膜上。

3. 蛋白酶的水解和其他加工过程

有些多肽,如某些生长因子和某些病毒囊膜蛋白,在糙面内质网中切除信号肽后便成为有活性的成熟多肽。还有很多肽激素和神经多肽(neuropeptides)当转运至高尔基体的 TGN 或 TGN 所形成的分泌小泡中时,在与 TGN 膜相结合

的蛋白水解酶的作用下，经特异地水解(常常发生在与一对碱性氨基酸相邻的肽键上)才成为有生物活性的多肽。

不同的蛋白质在高尔基体中酶解加工的方式各不相同，可归纳为以下几种类型：

(1) 比较简单的形式是没有生物活性的蛋白原(proprotein)进入高尔基体后，将蛋白原 N 端或两端的序列切除形成成熟的多肽。如胰岛素、胰高血糖素及血清蛋白(如白蛋白等)。

(2) 有些蛋白质分子在糙面内质网中合成时便是含有多个相同氨基酸序列的前体，然后在高尔基体中水解成同种有活性的多肽，如神经肽等。

(3) 某些蛋白分子的前体中含有不同的信号序列，最后加工成不同的产物；有些情况下，同一种蛋白质前体在不同的细胞中可能以不同的方式加工而产生不同种的多肽，这样大大增加了细胞信号分子的多样性。不同的多肽采用不同的加工方式，推测其原因是：① 有些多肽分子太小，在核糖体上难以有效地合成，如仅由 5 个氨基酸残基组成的神经肽；② 有些可能缺少包装并转运到分泌泡中的必要信号；③ 更重要的是可以有效地防止这些活性物质在合成它的细胞内起作用，假如胰岛素在糙面内质网中合成后便具有生物活性，那么它很可能与内质网膜上的受体结合启动错误的反应。胰岛素即使进入分泌泡后也不会与受体结合，因为它仅在 pH7 左右的条件下与受体结合，而储存胰岛素的分泌泡中 pH 为 5.5。

硫酸化作用也在高尔基体中进行。硫酸化反应的硫酸根供体，是 3′－磷酸腺苷－5′－磷酸硫酸(3′－phosphoadenosine－5′－phosphosulfate，PAPS)，它从细胞质基质中转入高尔基体膜囊内，在酶的催化下，将硫酸根转移到肽链中酪氨酸(tyrosine)残基的羟基上。硫酸化的蛋白质主要是蛋白聚糖。

三、高尔基体与细胞内的膜泡运输

高尔基体在细胞内膜泡蛋白运输中起重要的枢纽作用(图 6－10)。有人称之为细胞中的“交通警察”，这方面的详情将在第五节讨论。

自 1954 年 Dalton 和 Felix 首次在电镜下观察到高尔基体，结束了关于高尔基体是否存在的争论以来，对高尔基体的研究虽然取得了重大进展，但对其结构与功能的争论却一直延续至今。从对高尔基体长期的争论中，从不乏权威学者提出的模式一个个被否定的研究史中，可以看出：

每次争论的结束和新一轮争论的挑起往往伴随着技术的进步。如 20 世纪 50 年代电镜技术的建立；60 和 70 年代的酶的细胞化学、放射自显影和细胞组分分离技术的建立；80 和 90 年代的 DNA 重组技术的出现、高尔基体体外模式的建立以及对酵母突变株的研究等。因此，真正揭示高尔基体结构和功能的奥秘需凭借强有力的实验手段和确凿的实验证据以及从各种不同的实验均可得出的同样的结论，这样的模型才能经得住时间的考验。仔细分析高尔基体研究这段

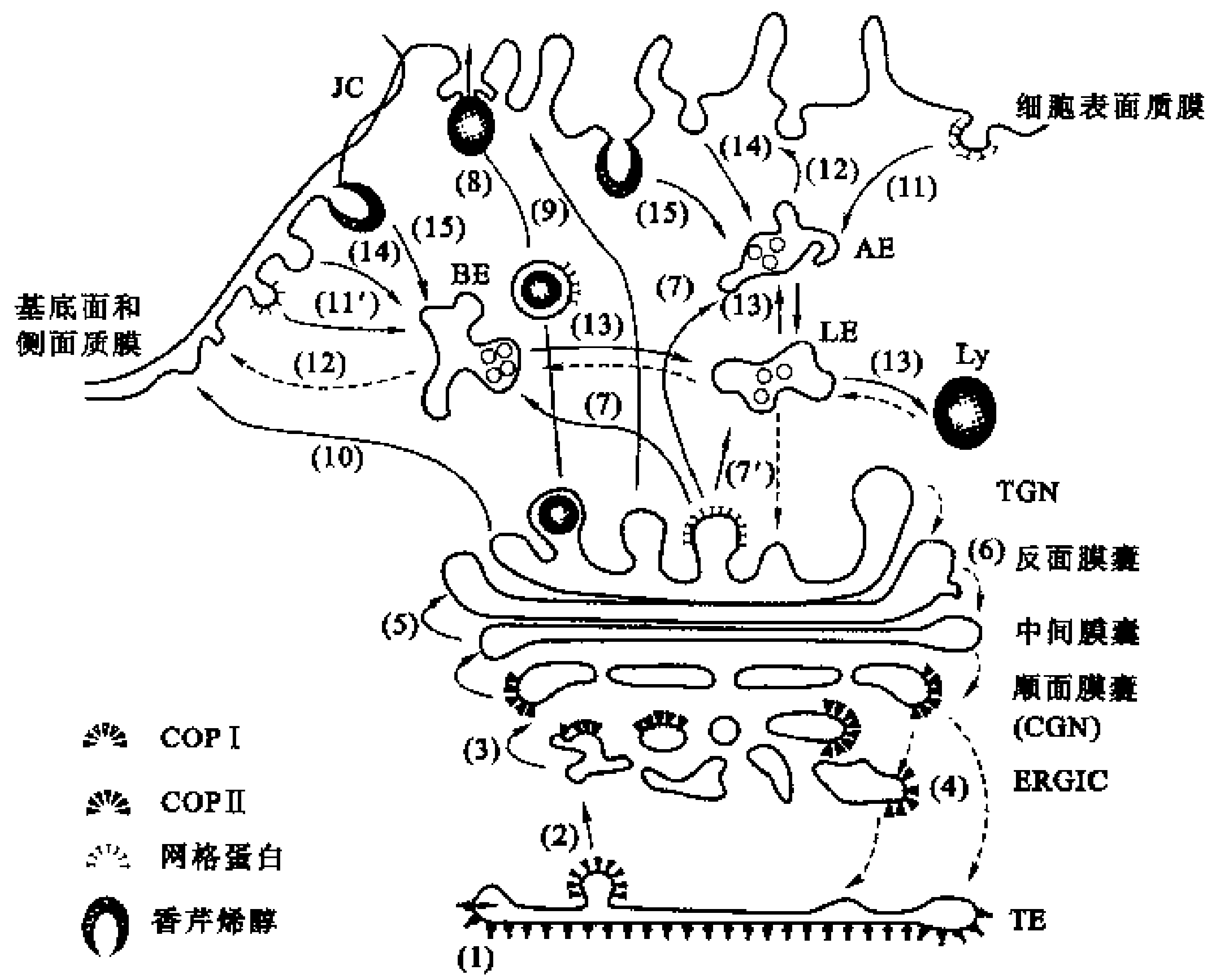


图 6 - 10 膜泡运输的主要途径(1~15),其中多数与高尔基体直接相关

十分有趣的科学史,显然对我们如何对待和解决生物学问题会有一定的启迪。

第四节 溶酶体与过氧化物酶体

溶酶体(lysosome)是单层膜围绕、内含多种酸性水解酶类的囊泡状细胞器。其主要功能是进行细胞内的消化作用。

与其他细胞器不同,溶酶体存在的最早证据不是来自形态观察,而是在用差速离心方法分析细胞组分时获得的。1949 年,de Duve 将大鼠肝组织匀浆,并对其中各种细胞器进行分级分离,以期找出哪些细胞器与糖代谢的酶有关。在测定作为对照的酸性磷酸酶活性时,发现酶的活性主要在线粒体的组分中。但实验结果却出现了一些反常的现象,如蒸馏水提取物中酶的活性比在蔗糖渗透平衡液抽提物中酶的活性高。放置一段时间的抽提物比新鲜制品中的酶活性高,而且其酶的活性却与沉淀物线粒体无关,随后又发现其他几种水解酶也有类似的现象。从而推测在线粒体组分中还存在一种新的细胞器。1955 年,de Duve 与 Novikoff 合作首次用电子显微镜证明了溶酶体的存在。

溶酶体几乎存在于所有的动物细胞中,植物细胞内也有与溶酶体功能类似的细胞器——圆球体及植物中央液泡,原生动物细胞中也存在类似溶酶体的结构。典型的动物细胞中约含有数百个溶酶体,但在不同的细胞内溶酶体的数量

和形态有很大差异，即使在同一种细胞中，溶酶体的大小、形态也有很大区别，这主要是由于每个溶酶体处于其不同生理功能阶段的缘故。

溶酶体在维持细胞正常代谢活动及防御等方面起着重要作用，特别是在病理学中具有重要意义，因此越来越引起人们对溶酶体研究的高度重视。

一、溶酶体的结构类型

溶酶体是一种异质性(heterogenous)细胞器，这是指不同的溶酶体的形态大小，甚至其中所包含的水解酶的种类都可能有很大的不同。根据溶酶体所处的完成其生理功能的不同阶段，大致可分为初级溶酶体(primary lysosome)、次级溶酶体(secondary lysosome)和残余体(residual body)。

初级溶酶体呈球形，直径约0.2～0.5μm，内容物均一，不含有明显的颗粒物质，外面由一层脂蛋白膜围绕，厚度为7.5 nm(图6-11)。其中含有多种水解酶类，如蛋白酶、核酸酶、糖苷酶、酯酶、磷脂酶、磷酸酶和硫酸酶等，其共同的特征是都属酸性水解酶，即酶的最适pH为5左右。如将氢氧化氨或氯奎(chloroquine)等可穿透细胞膜的碱性物质加入细胞培养液中，使溶酶体中pH提高至7左右，则可使溶酶体酶失去活性。

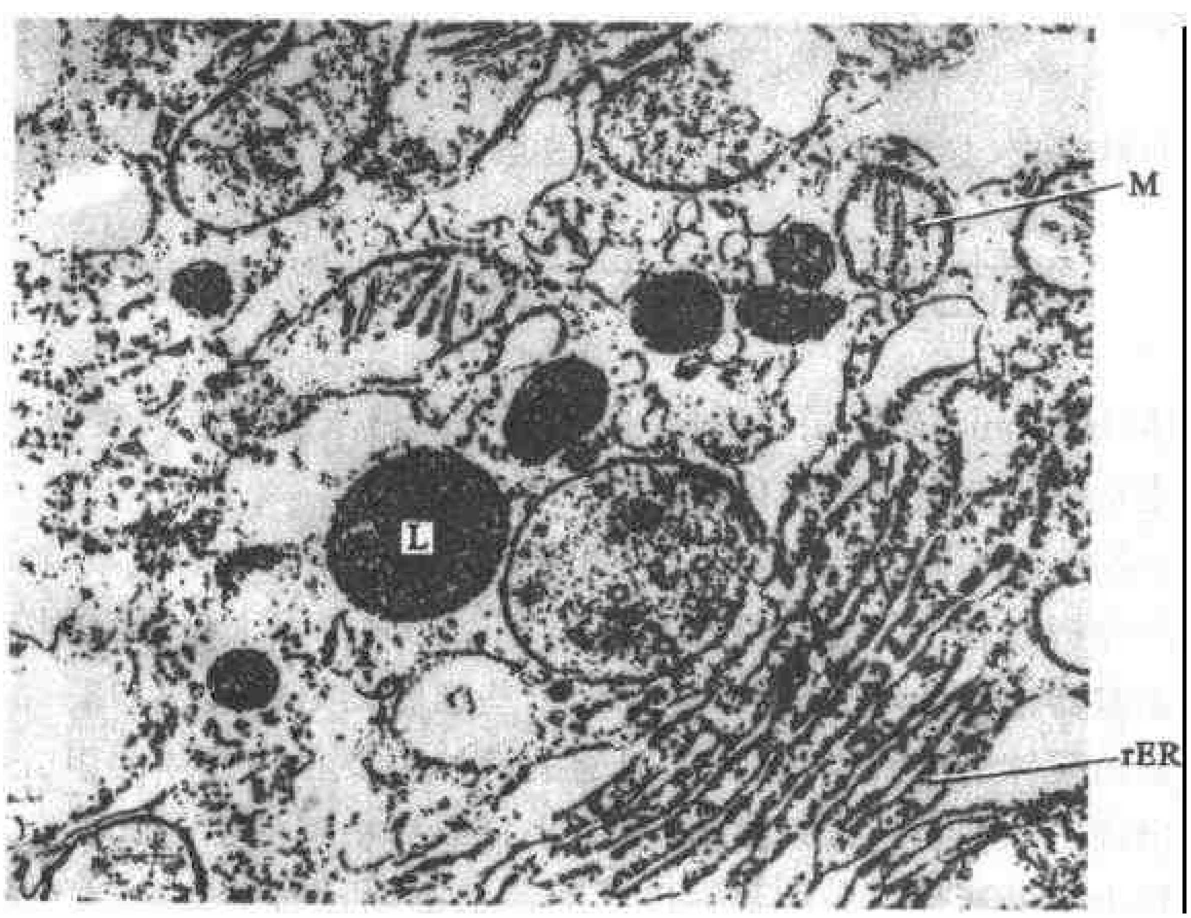


图6-11 小鼠脾脏巨噬细胞中的溶酶体(朴英杰)
用电镜细胞化学技术显示其中含有的酸性磷酸酶；M：线粒体；L：溶酶体

溶酶体膜在成分上也与其他生物膜不同：① 嵌有质子泵，借助水解ATP释放出的能量将H^+泵入溶酶体内，使溶酶体中的H^+浓度比细胞质中高100倍以上，以形成和维持酸性的内环境；② 具有多种载体蛋白用于水解的产物向外转

运;③ 膜蛋白高度糖基化,可能有利于防止自身膜蛋白的降解。

目前已发现 60 余种溶酶体的酶类,多数为可溶性的酶,有些整合在溶酶体膜上。酶蛋白本身的结构能抗御酸变性作用。已克隆了近 20 种酶的 cDNA,并测出了一些酶的基因序列,发现溶酶体的酶具有某些特征的同源序列。此外,催化相关反应的某种溶酶体的酶和非溶酶体酶之间,蛋白质一级结构也非常相似,甚至与低等真核生物及原核生物的有关酶也非常相似。显然,溶酶体的酶与相关的非溶酶体酶是属于结构与功能上相似的一类酶的家族,推测它们在进化中有共同的起源。

次级溶酶体是初级溶酶体与细胞内的自噬泡或异噬泡、胞饮泡或吞噬泡融合形成的复合体,分别称之为自噬溶酶体(autophagolysosome)和异噬溶酶体(phagolysosome),二者都是进行消化作用的溶酶体。次级溶酶体中可能包含多种生物大分子、颗粒性物质、线粒体等细胞器乃至细菌等,因此其形态不规则,直径可达几个微米。电镜显示其内部结构非常复杂,常含有颗粒、膜片甚至某些细胞器。

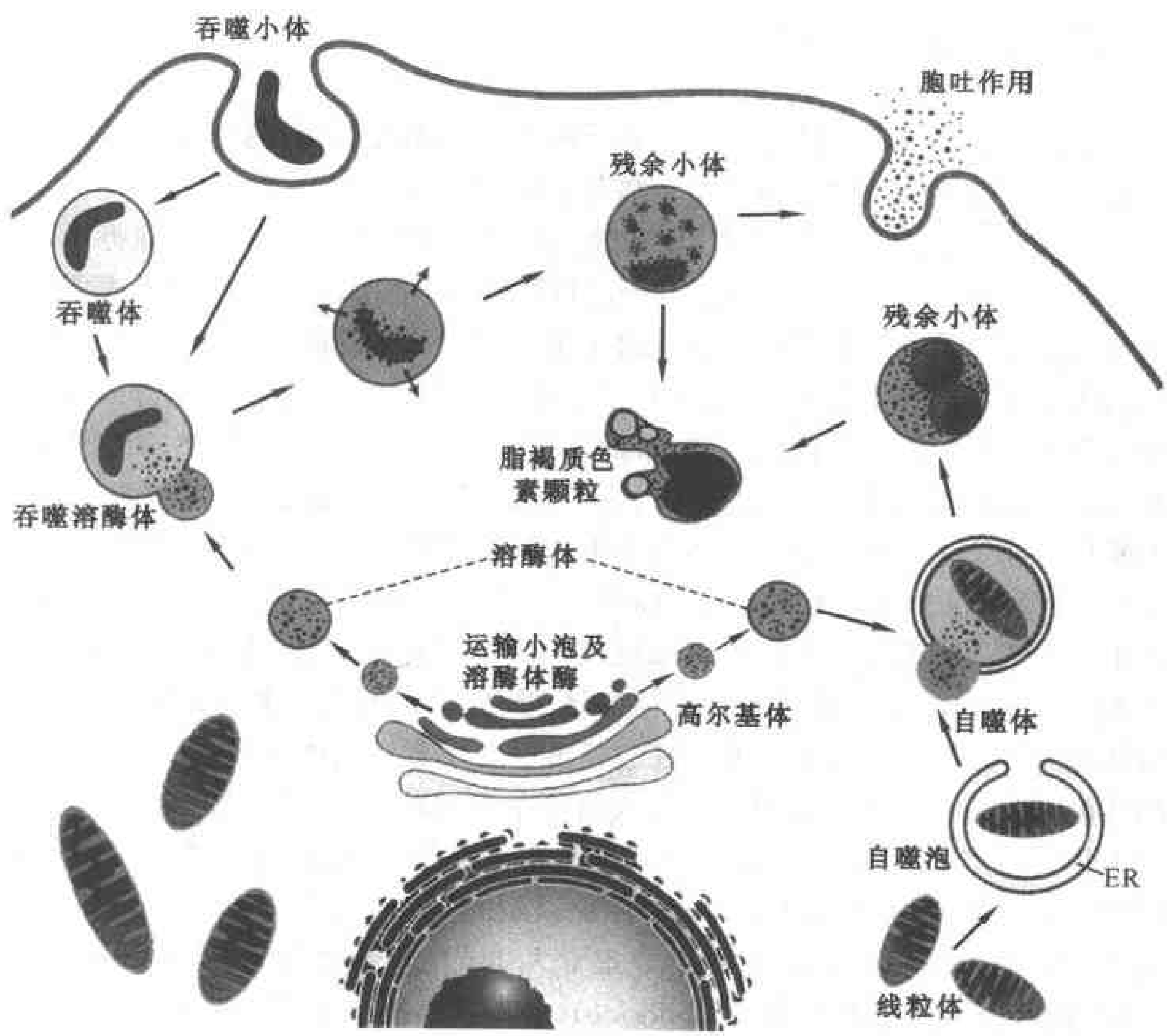


图 6-12　动物细胞溶酶体系统示意图

经过一段时间的消化后，小分子物质可通过膜上的载体蛋白转运到细胞质基质中，供细胞代谢使用。未被消化的物质残存在溶酶体中形成残余小体或称后溶酶体。残余小体可通过类似胞吐的方式将内容物排出细胞(图 6－12)。

用溶酶体的标志酶反应，可辨认出不同形态与大小的溶酶体。酸性磷酸酶(acid phosphatase)是常用的标志酶，用这种方法不仅有助于研究溶酶体的发生与成熟过程，而且还发现了多泡体、线状溶酶体等多种类型的溶酶体，但其机能尚不完全清楚。因此溶酶体可以看作是以含有大量酸性水解酶为共同特征的、不同形态大小、执行不同生理功能的一类异质性的细胞器。少量的溶酶体酶泄露到细胞质基质中，并不会引起细胞损伤，其主要原因是细胞质基质中的 pH 为 7.0 左右，在这种环境中溶酶体酶的活性大大降低。此外，在酵母细胞质中已发现一些蛋白可以特异地与溶酶体酶结合而使其丧失活性。植物细胞的液泡中含有多种水解酶类，具有与动物细胞溶酶体类似的功能。一般液泡约占细胞总体积的 30%以上，但在不同细胞中液泡体积从 5%直至 90%不等。除此之外，液泡还具有储存营养与废物、调节细胞体积增长及细胞膨压等多种作用。

二、溶酶体的功能

溶酶体的基本功能是对生物大分子的强烈的消化作用，这对于维持细胞的正常代谢活动及防御微生物的侵染都有重要的意义。

1. 清除无用的生物大分子、衰老的细胞器及衰老损伤和死亡的细胞

处于不同的细胞周期，不同的分化阶段及不同生理状态下的细胞，都需要一系列特定的酶系统。细胞生理状态的变化常常要通过酶系统的改变。原核细胞的快速增殖可稀释不需要的酶，但对于真核细胞则需要通过降解的方式来清除暂时不需要的酶或某些代谢产物，溶酶体参与完成这一功能。此外，细胞中的生物大分子及细胞器都有一定的寿命，为了保证细胞正常的代谢活动与调控，必须不断地清除衰老的细胞器和生物大分子。很多生物大分子的半寿期只有几小时至几天，肝细胞中线粒体的平均寿命约 10 天左右，细胞质膜也处在不断地更新之中。占成人细胞总数 1/4 的红细胞仅能存活 120 天，因此人体每天清除的红细胞多达 10^{11}个，这些任务主要由溶酶体(图 6－12)和蛋白酶体共同担负，即溶酶体起着“清道夫”的作用。其中还包括清除在发育和成体中凋亡的细胞。当溶酶体酶缺失或产生溶酶体酶的某个代谢环节出现故障时，上述物质就不能被水解而积留在溶酶体中，结果细胞成分与结构得不到更新，直接影响细胞的代谢，引起疾病。如台－萨氏(Tay－Sachs)病就是由于溶酶体中缺少 β－氨基己糖酯酶 A(β－N－hexosaminidase A)。在正常人体或哺乳动物细胞中，特别是神经细胞中，细胞膜的神经节苷脂(ganglioside)GM2 一直处于合成与降解的不断更新状态。由于缺少 β－氨基己糖酯酶 A，GM2 不能被溶酶体水解而积累在细胞内，特别是脑细胞中，造成精神呆滞，约 2～6 岁即死亡。除台－萨氏病外，已发现几十种这类型的疾病，其共同特征是细胞溶酶体内充满了未被降解的物质，因

此称为储积症，它是一种隐性的遗传病，已越来越引起人们的重视。溶酶体的酶对水解底物似乎没有选择性，但暂不需要的大分子和衰老的细胞器选择性地进入自噬泡，溶酶体识别并与之融合，这显然是一个精确的调控过程，其机制还不了解。对衰老细胞的清除主要是由巨噬细胞完成，如衰老的红细胞膜骨架发生改变，导致细胞韧性的改变，而不能进入比其直径更小的毛细血管中。同时细胞表面糖链中的唾液酸残基脱落，暴露出半乳糖残基，从而被巨噬细胞识别并捕获，进而被吞噬和降解。

2. 防御功能

防御功能是某些细胞特有的功能，它可以识别并吞噬入侵的病毒或细菌，在溶酶体作用下将其杀死并进一步降解。动物细胞中有几种吞噬细胞（phagocyte）常常位于肝、脾和其他血管通道中，用以清除形成抗原抗体复合物的有机体颗粒及吞噬的细菌、病毒等入侵者。同时也不断清除衰老死亡的细胞和血管中颗粒物质。当机体被感染后，单核细胞（monocyte）移至感染或发炎的部位，分化成巨噬细胞，巨噬细胞中溶酶体非常丰富，并含有过氧化氢、超氧物（O_2^-）等与溶酶体酶等共同作用杀死细菌，电镜下巨噬细胞内常常可以见到较多残余小体，这也可能是为什么它的寿命只有1～2天的缘故。

某些病原体被细胞摄入，进入吞噬泡或胞饮泡中但并未被杀死，如麻风杆菌（*Mycobacterium leprae*）、利什曼原虫（*Leishmania*）等，它们可在巨噬细胞的吞噬泡中繁殖，其原因主要是通过抑制吞噬泡的酸化从而抑制了溶酶体酶的活性。一些病毒也是借助受体介导的细胞胞吞作用而侵入宿主细胞的，它们巧妙地利用胞内体中的酸性环境将病毒核壳释放到细胞基质中。如在细胞培养液中加入氢氧化铵或氯奎等碱性试剂，将胞吞泡中的pH提高至7左右，则病毒虽然能进入细胞，但却不能将其核壳从胞内体中释放到细胞质基质中，因而也就不能在细胞中繁殖。

3. 其他重要的生理功能

(1) 作为细胞内的消化"器官"为细胞提供营养，如降解内吞的血清脂蛋白，获得胆固醇等营养成分。很多单细胞真核生物如粘菌、变形虫等靠吞噬细菌和某些真核微生物而生存，其溶酶体的消化作用就显得更为重要。饥饿状态下，溶酶体可分解细胞内的生物大分子以保证机体所需的能量。在肝细胞中，每小时降解的蛋白质占肝细胞蛋白总量的4.5%，这一过程主要由溶酶体完成。

(2) 在分泌腺细胞中，溶酶体常常含有摄入的分泌颗粒，可能参与分泌过程的调节。在甲状腺中，甲状腺球蛋白（thyroglobin）储存在腺体内腔中，通过吞噬作用进入分泌细胞内并与溶酶体融合，甲状腺球蛋白被水解成甲状腺素，然后分泌到细胞外的毛细血管中。

(3) 两栖类发育过程中蝌蚪尾巴的退化、哺乳动物断奶后乳腺的退行性变化等都涉及某些特定细胞编程性死亡及周围活细胞对其的清除，这些过程都与溶酶体有关。

(4) 在受精过程中的作用，精子的顶体（acrosome）相当于特化的溶酶体，其

中含多种水解酶类，如透明质酸酶、酸性磷酸酶、β - N - 乙酰葡萄糖胺酶及蛋白水解酶等，它能溶解卵细胞的外被及滤泡细胞，产生孔道，使精子进入卵细胞。精子冷冻保存中的技术难题之一就是防止顶体的破裂。

三、溶酶体的发生

在高尔基体一节已提到溶酶体酶是在糙面内质网上合成并经 N - 连接的糖基化修饰，然后转至高尔基体，在高尔基体的顺面膜囊中寡糖链上的甘露糖残基发生磷酸化形成 M6P，在高尔基体的反面膜囊和 TGN 膜上存在 M6P 的受体，这样溶酶体的酶与其他蛋白区分开来，并得以浓缩，最后以出芽的方式转运到溶酶体中(图 6 - 13)。对这一过程的细节已有了进一步的了解。

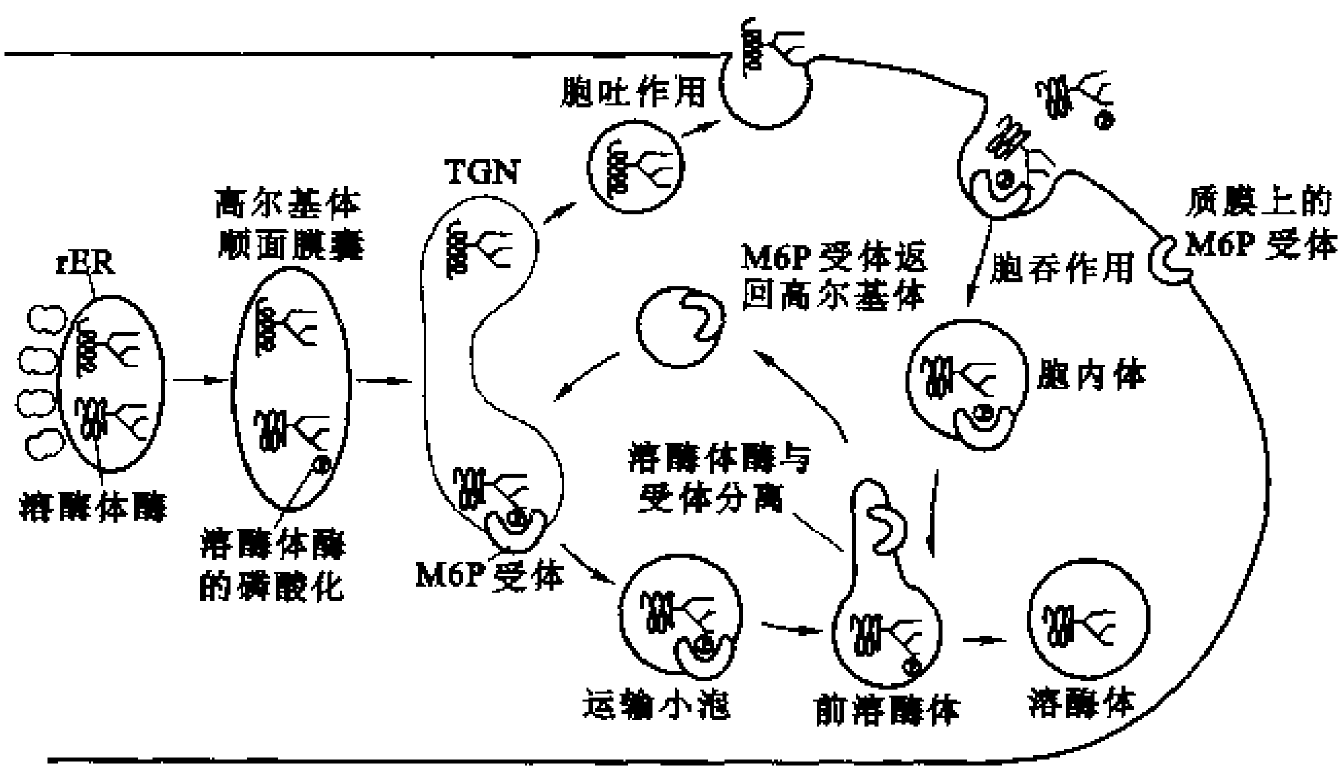


图 6 - 13 溶酶体的发生过程

溶酶体酶甘露糖残基的磷酸化先后由两种酶催化：一种是 N - 乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶（N - acetylglucosamine phosphotransferase，GlcNAc - P - ransferase)；另一种是磷酸葡萄糖苷酶(phosphoglycosidase)。当溶酶体酶进入高尔基体的顺面膜囊后，N - 乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶将单糖核苷酸(suger nucleotide)UDP - GlcNAc 上的 GlcNAc - P 转移到高甘露糖寡糖链上的 α - 1，6 - 甘露糖残基上，再将第二个 GlcNAc - P 加到 α - 1，3 - 甘露糖残基上，接着在高尔基体中间膜囊中磷酸葡萄糖苷酶除去末端的 GlcNAc 暴露出磷酸基团，形成 M6P 标志。

上述反应涉及磷酸转移酶如何从自内质网转入高尔基体的多种蛋白中识别溶酶体酶，现已确定在溶酶体酶分子中存在识别信号，这种信号不是一段肽链而是依赖于溶酶体酶的构象或三级结构形成的信号区(signal patch)。其他部位可使信号识别作用更为有效。

一旦磷酸转移酶识别了溶酶体酶的信号区后，在每条寡糖链上便可以同时形成几个 M6P，而多数溶酶体酶分子上具有多个 N－连接的寡糖链。如果当一个溶酶体酶分子与一个磷酸转移酶的识别位点相结合时，其亲和常数为 Ka＝10^5L/mol，在高尔基体的 TGN 中，含有多个 M6P 的溶酶体酶与 M6P 受体结合，其亲和常数 Ka 可达 10^9L/mol，前后对比放大了 10 000 倍。在高尔基体的 TGN 中，受体分子集中地分布在 TGN 膜的某些部位，使溶酶体酶与其他的蛋白质分离并起到局部浓缩的作用，从而保证了它们以出芽的方式向溶酶体中转移。M6P 受体有两种，其中一种是依赖钙的受体，它也作为胰岛素类生长因子Ⅱ的受体，这种受体已被纯化，它在 pH 为 7 左右时与 M6P 结合，而 pH 为 6 以下则与 M6P 分离。

TGN 上形成的转移小泡首先将溶酶体酶转运到前溶酶体（prelysosome）中，有人认为前溶酶体是载有溶酶体酶的转运小泡与某种胞内体（endosome）融合形成，因此又称之为内吞溶酶体（endolysosome）。还有的学者认为前溶酶体即为初级溶酶体。前溶酶体的基本特征是脂蛋白膜上具有质子泵，腔内呈酸性，pH 为 6 左右。用抗 M6P 受体的抗体进行免疫标记显示 M6P 受体存在于高尔基体的 TGN 和前溶酶体膜上，但不存在于溶酶体膜上。如用弱碱性试剂处理体外培养细胞，则 M6P 受体从高尔基体的 TGN 上消失而仅存在于前溶酶体膜上。这一结果提示，M6P 受体穿梭于高尔基体和前溶酶体之间。在高尔基体的中性环境中，M6P 受体与 M6P 结合，进入前溶酶体的酸性环境中后，M6P 受体与 M6P 分离，并返回高尔基体中。同时在前溶酶体中，溶酶体酶蛋白中的 M6P 去磷酸化，进一步促使 M6P 受体与之彻底分离。载有溶酶体酶的运输小泡从 TGN 出芽的过程需要网格蛋白的帮助，运输小泡形成后网格蛋白便脱离运输小泡。

溶酶体酶的 M6P 特异标志是目前研究高尔基体分选机制中了解得较为清楚的一条途径。然而这一分选体系的效率似乎不很高，一部分含有 M6P 标志的溶酶体酶会通过运输小泡直接分泌到细胞外。在细胞膜上，存在依赖于 Ca^{2+} 的 M6P 受体，它同样可与胞外的溶酶体酶结合，在网格蛋白协助下通过受体介导的胞吞作用，将酶送至前溶酶体中。M6P 受体也同样可返回细胞膜，反复使用。分泌到细胞外的溶酶体酶多数以酶前体的形式存在，且具有一定的活性，但蛋白酶是一例外，其前体没有活性。蛋白酶需要进一步切割与加工才能成为有活性的蛋白酶，这一过程是否发生在前溶酶体或溶酶体中，尚不清楚。M6P 分选途径并非溶酶体酶分选的唯一方式，前面已提到在Ⅰ细胞病人的肝细胞中虽然不能形成 M6P 标志，但仍可产生溶酶体，说明至少还存在另一条不依赖于 M6P 的分选途径。

已发现在正常淋巴细胞中，如在细胞毒 T 细胞和自然杀伤 T 细胞的溶酶体中，既含有溶酶体酶也含有水溶性蛋白穿孔素（perforin）和粒酶（granzyme）。溶酶体酶是通过依赖于 M6P 的途径进入溶酶体；而后者是通过不依赖 M6P 的途径进入溶酶体。当接到外界信号后，这类溶酶体会像分泌泡一样释放内含的物质，杀伤靶细胞，因此又称这类溶酶体为分泌溶酶体（secretory lysosome）。

在溶酶体中，除了水溶性的酶外，还有一些是结合在膜上的酶，如葡萄糖脑苷脂酶(glucocerebrosidase)，此外还有溶酶体膜上的特异膜蛋白，这些蛋白也是在内质网上合成，经高尔基体加工与分类的。M6P标志的作用是把可溶性的蛋白结合在特异膜受体上，因此溶酶体的膜蛋白就不必要M6P化，但这些膜蛋白如何同其他蛋白区分开来而特异地分送到溶酶体中，其机制还不清楚。

实际上，溶酶体的发生可能是多种途径的复杂过程。不同种类的细胞可能采取不同的途径，同一种细胞也可能有不同的方式，甚至某些酶还可能通过不同的渠道进入溶酶体中。如酸性磷酸酶合成时是一种跨膜蛋白，但它并不涉及M6P途径，而像其他质膜蛋白那样经高尔基体转运到细胞表面，随后依赖于其细胞质基质部分酪氨酸残基信号，从细胞表面转运到溶酶体中，在细胞质中的巯基蛋白酶和溶酶体中的天冬氨酸蛋白酶的作用下成为水溶性的酶。酸性磷酸酶常常作为鉴定溶酶体的主要标志酶，如果能进一步了解它的合成与复杂的转运机制，显然有助于我们对实验结果的正确理解与分析。

溶酶体酶的加工常常发生在它们进入溶酶体以后，不同种酶的加工方式也各自不同，然而有些加工，如糖侧链的部分水解，可能是溶酶体内特定环境造成的，对酶的活性并非必要。

四、溶酶体与过氧化物酶体

过氧化物酶体(peroxisome)又称微体(microbody)，是由单层膜围绕的、内含一种或几种氧化酶类的细胞器(图6-14)。1954年Rhodin首次在鼠肾的肾小管上皮细胞中观察到这种细胞器。由于过氧化物酶体在形态大小及降解生物大分子等功能上与溶酶体类似，再加上过氧化物酶体也是一种异质性的细胞器，其确切的生理功能尚不清楚，因此人们在很长时间里把它看作是某种溶酶体，直至20世纪70年代才逐渐确认过氧化物酶体是一种与溶酶体完全不同的细胞器。它普遍地存在于所有动物细胞和很多植物细胞中。早年以大鼠肝组织及种子植物的种子作为研究过氧化物酶体的实验材料。近些年来，人们从几种酵母菌及成纤维细胞中筛选出一系列过氧化物酶体缺陷突变株，进而克隆了18种之多与过氧化物酶体发生相关的基因(称*Pex*基因，对应的蛋白称peroxin)，从而对这一细胞器的成分、功能及其发生过程有了进一步了解。

1．过氧化物酶体与溶酶体的区别

过氧化物酶体和初级溶酶体的形态与大小类似，但过氧化物酶体中的尿酸氧化酶等常形成晶格状结构，因此可作为电镜下识别的主要特征。此外，这两种细胞器在成分、功能及发生方式等方面都有很大的差异，详见表6-3所示。

2．过氧化物酶体的功能

过氧化物酶体是一种异质性的细胞器，不同生物的细胞中，甚至单细胞生物的不同个体中所含酶的种类及其行使的功能都有所不同。如在含糖培养液中生长的酵母细胞内过氧化物酶体的体积很小，但当它生长在甲醇培养液中时，过氧

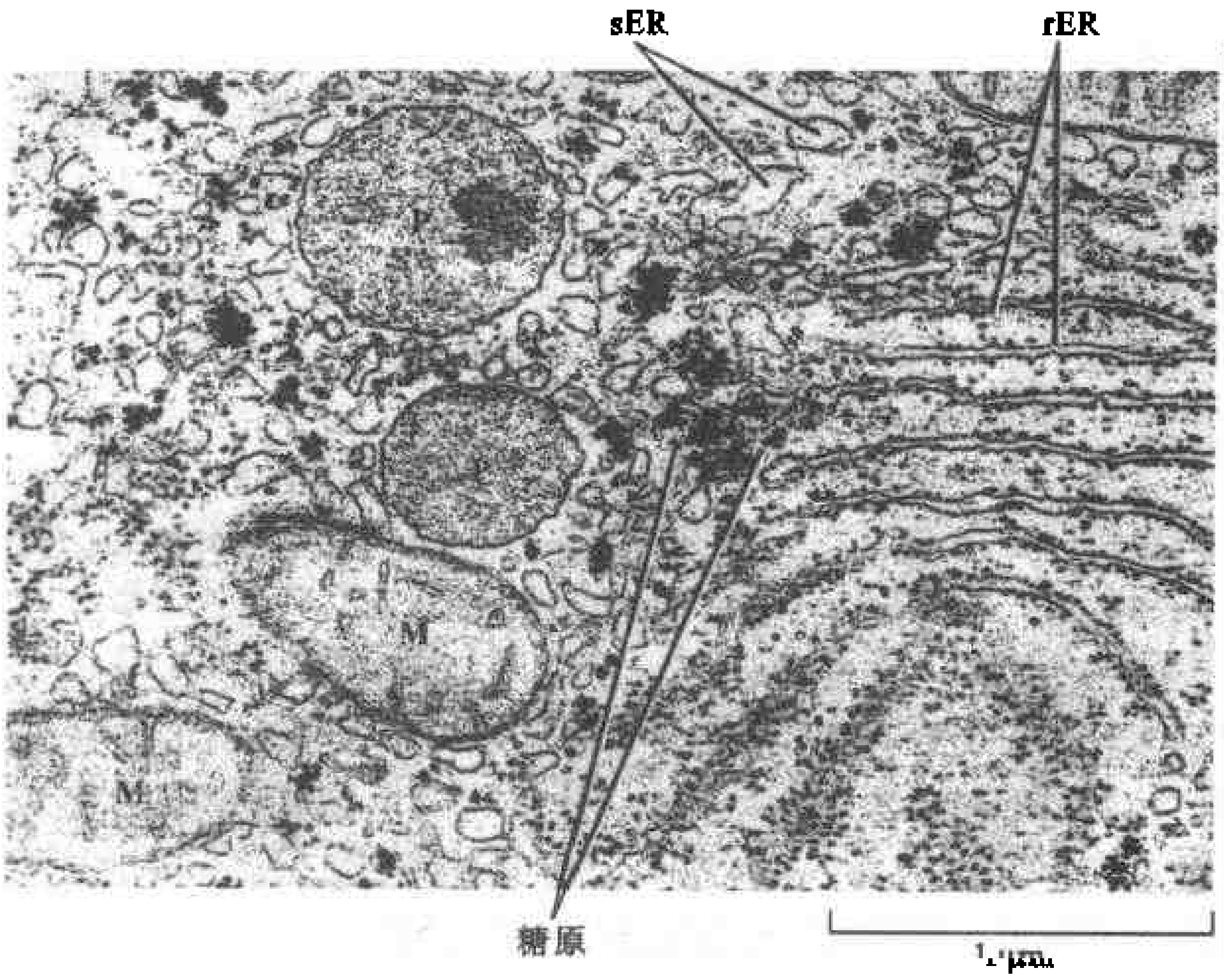


图 6－14 鼠肝细胞超薄切片所显示的过氧化物酶体(P)和其他细胞器如线粒体(M)等(Albert *et al*. ,1989)

化物酶体体积增大,数量增多,并能氧化甲醇;当酵母生长在脂肪酸培养基中,过氧化物酶体非常发达,并可把脂肪酸分解成乙酰辅酶A供细胞利用。

表 6－3 过氧化物酶体与初级溶酶体的特征比较

特 征	溶 酶 体	微 体
形态大小	多呈球形,直径 0.2－0.5μm,无酶晶体	球形,哺乳动物细胞中直径多在 0.15～0.25μm,内常有酶晶体
酶种类	酸性水解酶	含有氧化酶类
pH	5 左右	7 左右
是否需 O_2	不需要	需要
功能	细胞内的消化作用	多种功能
发生	酶在糙面内质网合成经高尔基体出芽形成	酶在细胞质基质中合成,经分裂与装配形成
识别的标志酶	酸性水解酶等	过氧化氢酶

对动物细胞中过氧化物酶体的功能了解很少,已知在肝细胞或肾细胞中,它可氧化分解血液中的有毒成分,起到解毒作用。例如饮进的酒精几乎半数是在过氧化物酶体中氧化成乙醛的。

过氧化物酶体中常含有两种酶:一是依赖于黄素(FAD)的氧化酶,其作用是将底物氧化形成 H_2O_2;二是过氧化氢酶,其含量常占过氧化物酶体总蛋白量的 40%,它的作用是将 H_2O_2 分解,形成水和氧气。由这两种酶催化的反应,相互偶联,从而可使细胞免受 H_2O_2 的毒害。

过氧化物酶体可降解生物大分子，最终产生 H_2O_2，而其中的多数反应在其他细胞器中也可进行，并不产生 H_2O_2。因此有的学者提出，过氧化物酶体的另一种功能是，分解脂肪酸等高能分子向细胞直接提供热能，而不必通过水解 ATP 的途径获得热能。在植物细胞中过氧化物酶体起着重要的作用。一是在绿色植物叶肉细胞中，它催化 CO_2 固定反应副产物的氧化，即所谓光呼吸反应；二是在种子萌发过程中，过氧化物酶体降解储存在种子中的脂肪酸产生乙酰辅酶 A，并进一步形成琥珀酸，琥珀酸离开过氧化物酶体进一步转变成葡萄糖。因上述转化过程伴随着一系列称为乙醛酸循环的反应，因此又将这种过氧化物酶体称为乙醛酸循环体（glyoxysome）。在动物细胞中没有乙醛酸循环反应，因此动物细胞不能将脂肪中的脂肪酸直接转化成糖。

3. 过氧化物酶体的发生

早期人们认为过氧化物酶体的发生与溶酶体类似，但现有的证据表明，过氧化物酶体的发生过程与线粒体或叶绿体类似，已有的过氧化物酶体经分裂后形成子代的过氧化物酶体（图 6－15 ④），子代的过氧化物酶体还需要进一步装配形成成熟的细胞器。但在过氧化物酶体中不含 DNA。

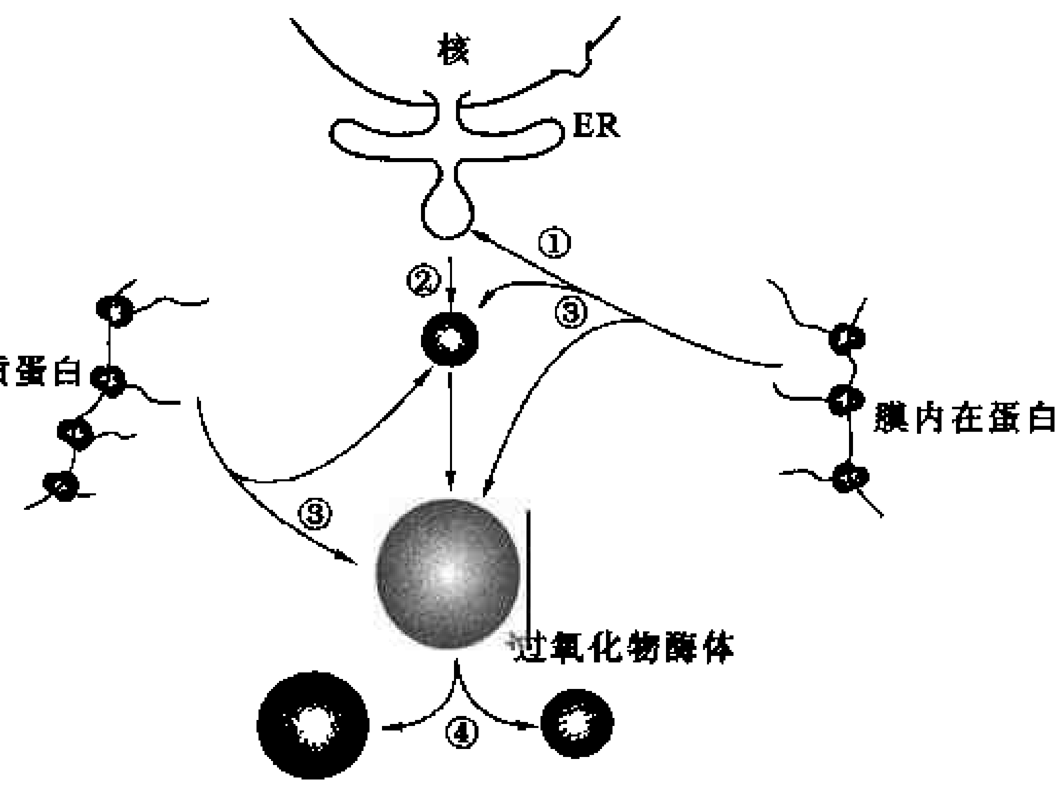


图 6－15　过氧化物酶体发生过程的示意图

组成过氧化物酶体的蛋白均由细胞核基因编码，主要在细胞质基质中合成，然后转运到过氧化物酶体中。如过氧化氢酶，它是一个含血红素的四聚体蛋白，其单体在细胞质基质中合成后，在信号序列（导肽）的指导下进入过氧化物酶体，单体与血红素在过氧化物酶体基质中结合并形成四聚体。最近发现至少存在两种以上的过氧化物酶体蛋白分选的信号序列（peroxisomal targeting signal，PTS），其中 PTS1 为 Ser－lys－leu，存在于多数过氧化物酶体基质蛋白的 C 端。PTS2 为 Arg/Lys－Leu/Ile－5X－His/Gln－leu，存在于某些基质蛋白 N 端的前 20 至 30 个氨基酸序列中。

用研究两种蛋白特异相互作用的双杂交技术证明，过氧化物酶体膜上存在几种可与信号序列相识别的可能的受体蛋白。构成过氧化物酶体的膜脂可能在内质网上合成后，通过磷脂交换蛋白或膜泡运输的方式完成其转运。

最近研究表明内质网也参与过氧化物酶体的发生(图 6－15 ①②)。

第五节　细胞内蛋白质的分选与细胞结构的装配

哺乳动物细胞中一般可检测出 1 万～2 万种蛋白质，酵母细胞中也含有 5 000种以上的蛋白。除线粒体和植物细胞叶绿体中能合成少量蛋白质外，绝大多数的蛋白质均在细胞质基质中的核糖体上开始合成，然后转运至细胞的特定部位，也只有转运至正确的部位并装配成结构与功能的复合体，才能参与细胞的生命活动。这一过程称蛋白质的定向转运(protein targeting)或分选(protein sorting)。广义上讲，这一过程还应包括蛋白质从合成直至降解的整个过程。蛋白质分选与装配是一个涉及到多种信号调控的复杂而重要的细胞生物学问题。

一、信号假说与蛋白质分选信号

为什么有些蛋白质在细胞质基质中合成，而有些在糙面内质网上合成，是什么指令确定蛋白质在细胞内的合成部位以致最终影响蛋白质的命运呢?

1972 年，C. Milstein 等发现在骨髓瘤细胞中提取的免疫球蛋白分子的 N 端要比分泌到细胞外的免疫球蛋白分子 N 端的氨基酸序列多出一截。1975 年，G. Blobel 和 D. Sabatini 等根据进一步实验依据，提出了信号假说(signal hypothesis)，即分泌性蛋白 N 端序列作为信号肽，指导分泌性蛋白到内质网膜上合成，在蛋白合成结束之前信号肽被切除。经过十多年的深入研究，信号假说已得到普遍的承认。因此，G. Blobel 关于信号序列控制蛋白质在细胞内的转移与定位的研究成果，获得 1999 年诺贝尔医学和生理学奖。现已确认，指导分泌性蛋白在糙面内质网上合成的决定因素是蛋白质 N 端的信号肽(signal sequence 或 signal peptide)。信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)和内质网膜上的信号识别颗粒的受体(又称停泊蛋白 docking protein, DP)等因子协助完成这一过程。信号肽位于蛋白质的 N 端，一般有 16～26 个氨基酸残基，其中包括疏水核心区、信号肽的 C 端和 N 端等三部分(图 6－16)。原核细胞的一些分泌性蛋白的 N 端也具有信号序列。信号肽似乎没有严格的专一性，如大鼠的胰岛素原蛋白接上真核或原核细胞的信号肽，均可通过大肠杆菌的细胞膜分泌到细胞外。目前尚未发现共同的信号序列。信号识别蛋白由 6 种多肽和一个 7S 的 RNA 组成的复合物，相对分子质量约 325×10^3；它既可与新生肽信号序列和核糖体结合，又可与停泊蛋白结合。停泊蛋白相对分子质量为 72×10^3，存在于内质网上，可特异地与信号识别蛋白结合。

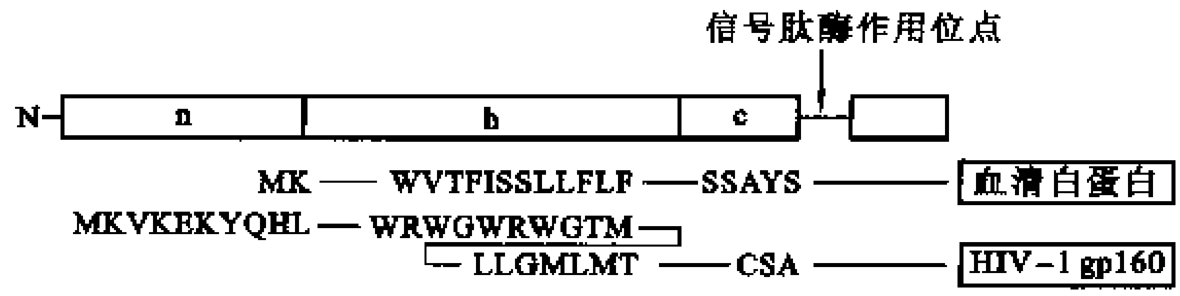


图 6-16　信号肽的一级序列

信号肽一级序列由疏水核心(h)、C端(c)和N端(n)三个区域构成。以血清白蛋白和HIV 1型病毒的糖蛋白gp160信号肽为例，显示出两者的n区长度明显不同

体外非细胞系统(cell free system)蛋白质合成的实验清楚地显示了信号肽、信号识别蛋白和停泊蛋白在蛋白质合成中的关系(表 6-4)。

表 6-4　在非细胞系统中蛋白质的翻译过程与 SRP、DP 和微粒体的关系

实验组别	含有编码信号序列的 mRNA	SRP	DP	微粒体	结　果
1	+	−	−	−	产生含信号肽的完整多肽
2	+	+		−	合成 70～100 氨基酸残基后，肽链停止延伸
3	+	+	+		产生含信号肽的完整多肽
4	+	+	+	+	信号肽切除，多肽链进入微粒体中

* “+”和“−”分别代表反应混合物中存在(+)或不存在(−)该物质

根据已知的研究资料，对表 6-4 中的结果及分泌性蛋白在内质网上合成过程的解释如图 6-17 所示。

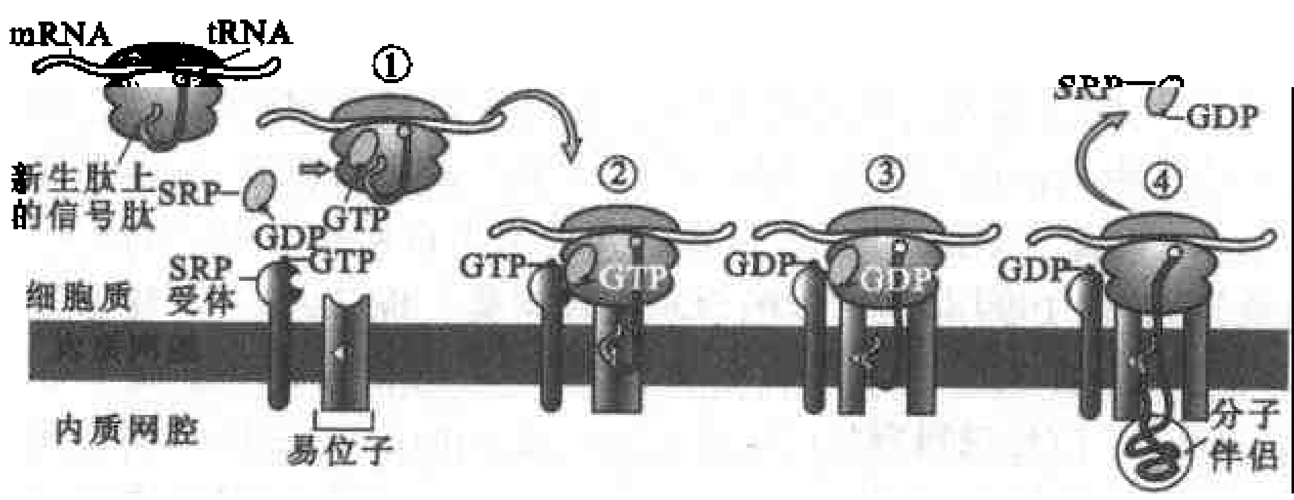


图 6-17　分泌性蛋白在内质网上合成过程(1～4)的图解

显示信号肽、SRP、SRP 受体及移位子之间的相互作用

蛋白质首先在细胞质基质游离核糖体上起始合成，当多肽链延伸至 80 个氨基酸左右后，N 端的信号序列与信号识别颗粒结合使肽链延伸暂时停止，并防止新生肽 N 端损伤和成熟前折叠，直至信号识别颗粒与内质网膜上的停泊蛋白(SRP 受体)结合，核糖体与内质网膜的易位子(translocon)结合　。此后，信号识别颗粒脱离了信号序列和核糖体，返回细胞质基质中重复使用，肽链又开始延伸。以环化构象存在的信号肽与易位子组分结合并使孔道打开，信号肽穿入内

质网膜并引导肽链以袢环的形式进入内质网腔中，这是一个需 GTP 的耗能过程。与此同时，腔面上的信号肽酶切除信号肽。肽链继续延伸直至完成整个多肽链的合成。这种肽链边合成边转移至内质网腔中的方式称共转移(cotranslocation)，引导肽链穿过内质网膜的信号肽可以看作为开始转移序列(start transfer sequence)。肽链中还可能有某些序列与内质网膜有很强的亲和力而结合在脂双层之中，这段序列不再转入内质网腔中，称为停止转移序列(stop transfer sequence)。如果一种多肽只有 N 端信号序列而没有停止转移序列，那么这种多肽合成后一般进入内质网腔中；如果一种多肽的停止转移序列位于分子的中部，那么这种多肽最终会成为跨膜蛋白。含有多个起始转移序列和多个停止转移序列的多肽将成为多次跨膜的膜蛋白。膜蛋白跨膜的拓扑学结构可能就是由这些蛋白质一级结构中的开始和停止转移序列共同决定的。

线粒体、叶绿体中绝大多数蛋白质以及过氧化物酶体中的蛋白质也是在某种信号序列的指导下进入这些细胞器中。为了研究方便，有人称之为导肽或前导肽(leader peptide)，其基本的特征是蛋白质在细胞质基质中合成以后再转移到这些细胞器中，因此称后转移(post translocation)。这种转移方式在蛋白质跨膜过程中不仅需要 ATP 使多肽去折叠，而且还需要一些蛋白质的帮助(如热休克蛋白 Hsp70)使其能够正确地折叠成有功能的蛋白。

继信号肽后，人们又发现一系列蛋白分选信号序列(表 6－5)统称信号序列(signal sequences)。有些还可能形成三维结构的信号称信号区指导蛋白转运至细胞的特定部位。

表 6－5 几种典型的蛋白分选信号序列

信号功能	举例
蛋白进入 ER	^+H_3N－Met－Met－Ser－Phe－Val－Ser－Leu－Ler－Leu－Val－Gly－Ile－Leu－Phe－Trp－Ala－Thr－Glu－Ala－Glu－Gln－Leu－Thr－Lys－Cys－Glu－Val－Phe－Gln－
滞留在 ER 中	－Lys－Asp－Glu－Leu－COO^-
蛋白进入线粒体	^+H_3N－Met－Leu－Ser－Leu－Arg－Gln－Ser－Ile－Arg－Phe－Phe－Lys－Pro－Ala－Thr－Arg－Thr－Leu－Cys－Ser－Ser－Arg－Tyr－Leu－Leu－
进入细胞核	－Pro－Pro－Lys－Lys－Arg－Lys－Val－
进入过氧化物酶体	－Ser－Lys－Leu－

注：^+H_3N 为蛋白 N 端；COO^- 为蛋白 C 端

二、蛋白质分选的基本途径与类型

蛋白质的分选大体可分两条途径：一条是在细胞质基质中完成多肽链的合成，然后转运至膜围绕的细胞器，如线粒体(或叶绿体)、过氧化物酶体、细胞核及细胞质基质的特定部位，最近发现有些还可转运至内质网中；另一条途径是蛋白质合成起始后转移至糙面内质网，新生肽边合成边转入糙面内质网腔中，随后经高尔基体运至溶酶体、细胞膜或分泌到细胞外，内质网与高尔基体本身的蛋白成

分的分选也是通过这一途径完成的(图 6－18)。

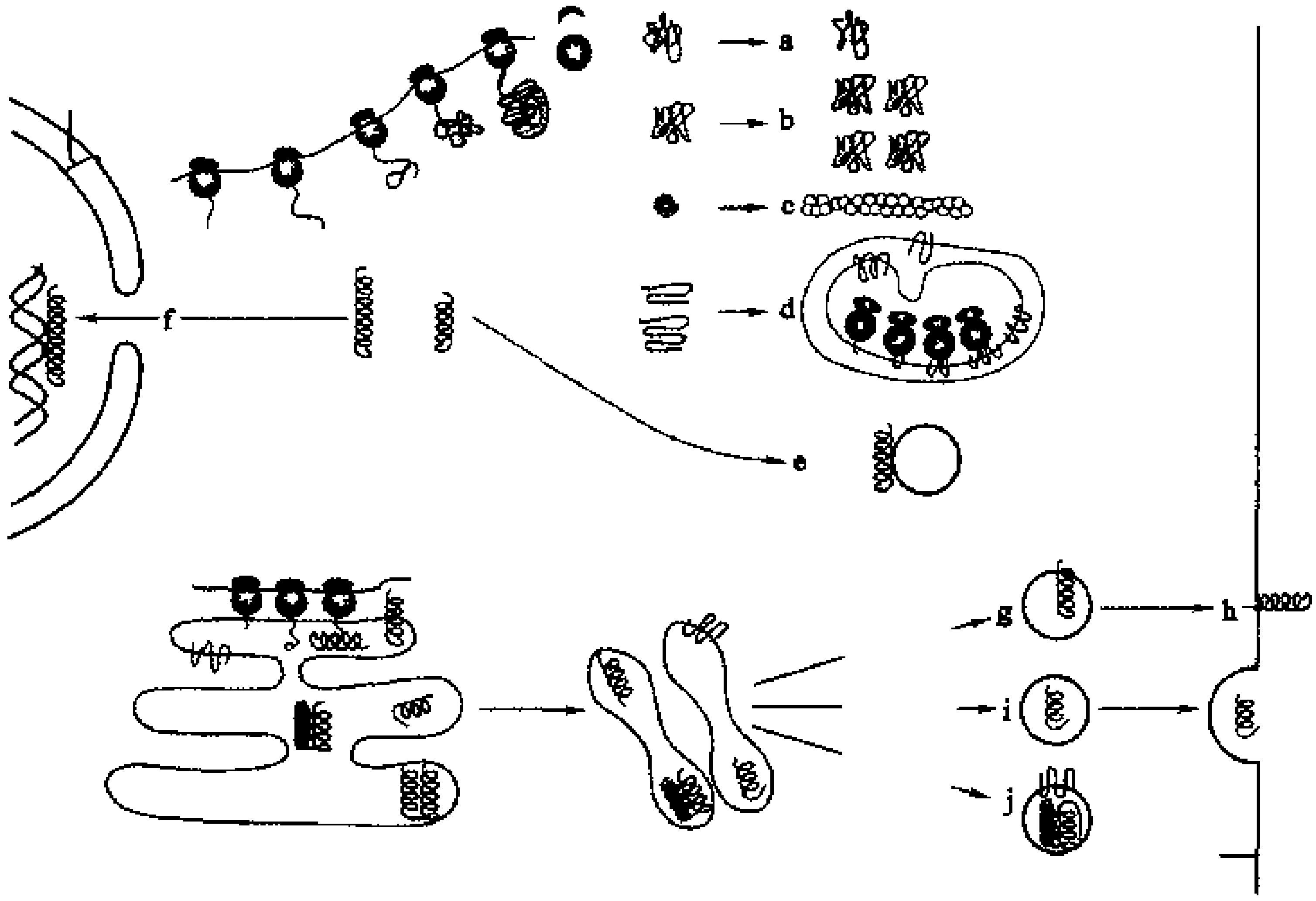


图 6－18　蛋白质的合成与转运

a～f 示细胞质基质中合成的蛋白质：a 为单体蛋白；b 为寡聚体蛋白；c 为纤维蛋白；d 为线粒体和叶绿体中的蛋白；e 为过氧化物酶体中的蛋白；f 为细胞核中的蛋白；g～j 为经高尔基体分选的蛋白：g 为质膜蛋白；i 为分泌到细胞外的蛋白；j 为溶酶体蛋白

如果从蛋白质分选的类型或机制的角度看，又可分为四种基本类型：

1．蛋白质的跨膜转运(transmembrane transport)

主要是指在细胞质基质中合成的蛋白质转运到内质网、线粒体、质体(包括叶绿体)和过氧化物酶体等细胞器，但进入内质网与进入线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器的机制又有所不同，参见第七章线粒体和叶绿体蛋白质的运送与装配。

2．膜泡运输(vesicular transport)

蛋白质通过不同类型的转运小泡从其糙面内质网合成部位转运至高尔基体进而分选运至细胞的不同部位，其中涉及各种不同的运输小泡的定向转运，以及膜泡出芽与融合的过程。

3．选择性的门控转运(gated transport)

是指在细胞质基质中合成的蛋白质通过核孔复合体选择性地完成核输入或从细胞核返回细胞质(参见第八章核孔复合体的选择性运输)。有人认为通过植物胞间连丝的蛋白也属这一类型。

4．细胞质基质中的蛋白质的转运

上述几种分选类型均涉及蛋白质在细胞质基质中的转运，这一过程显然与细胞骨架系统密切相关。但由于细胞质基质的结构尚不清楚，因此对其中的蛋白质转运特别是信号转导途径中的蛋白分子的转运及信号传递方式了解很少。

本节主要讨论第二种分选类型与机制，有关核孔复合体及核蛋白分选在第八章讨论。

三、膜泡运输

细胞必须具有有效而精密的机制，确保在糙面内质网上合成的各种蛋白，在高尔基体 TGN 区通过形成不同的转运泡以不同的途径被分选、转运，各就各位，发挥其特殊功能。膜泡运输是蛋白运输的一种特有的方式，普遍存在于真核细胞中。在转运过程中不仅涉及蛋白本身的修饰、加工和装配，还涉及到多种不同膜泡定向运输及其复杂的调控过程。

完成细胞内的膜泡运输至少需要 10 种以上的运输小泡，每种小泡表面都有特殊的标志以保证将转运的物质运至特定的细胞部位。目前发现三种不同类型的有被小泡具有不同的物质运输作用(图 6－19)。

1. 网格蛋白有被小泡

负责蛋白质从高尔基体 TGN 向质膜、胞内体或溶酶体和植物液泡运输。另外，在受体介导的细胞内吞途径中也负责将物质从质膜运往细胞质，以及从胞内体到溶酶体的运输。

高尔基体的 TGN 区是网格蛋白有被小泡形成的发源地，正如第五章所描述的那样，网格蛋白有被小泡在结构上包括两部分：一是由网格蛋白构成的蜂巢样的外层网络，形成结构骨架；二是由接合素蛋白构成的内壳，覆盖在面向细胞质基质侧的膜泡表面(图 5－11，图 6－20)。接合素蛋白(adaptors)介导两种不同蛋白组分的连接，在内表面结合素蛋白与膜受体尾端结合，而受体在膜泡腔面与特异性分子(配体)结合；在外表面(胞质基质面)接合素蛋白与网格蛋白分子结合，将网格蛋白骨架固定在膜泡表面。这些相互作用的结果是 TGN 腔内的特异性分子被浓缩进网格蛋白有被小泡，一旦从 TGN 区出芽形成转运泡，则网格蛋白包被脱落，然后有被小泡转运至相应的靶膜，或溶酶体、植物细胞的液泡，或细胞膜(图 6－20)。

2. COPⅡ有被小泡

负责从内质网到高尔基体的物质运输。COPⅡ包被蛋白由 5 种蛋白亚基组成，这些亚基首先在酵母细胞突变体中被鉴定，这些突变体不能完成从内质网到高尔基体的物质转运。随后在哺乳类细胞的内质网出芽时所形成的包被中也发现这些蛋白亚基的同源物。实验表明，应用这些蛋白的抗体可有效地阻止内质网膜小泡的出芽，但不影响高尔基体不同组分之间的膜泡运输。COPⅡ有被小泡具有对转运物质的选择性并使之浓缩。选择性的确定，一是因为 COPⅡ蛋白能识别并结合跨膜内质网蛋白胞质面一端的信号序列，二是跨膜内质网蛋白的

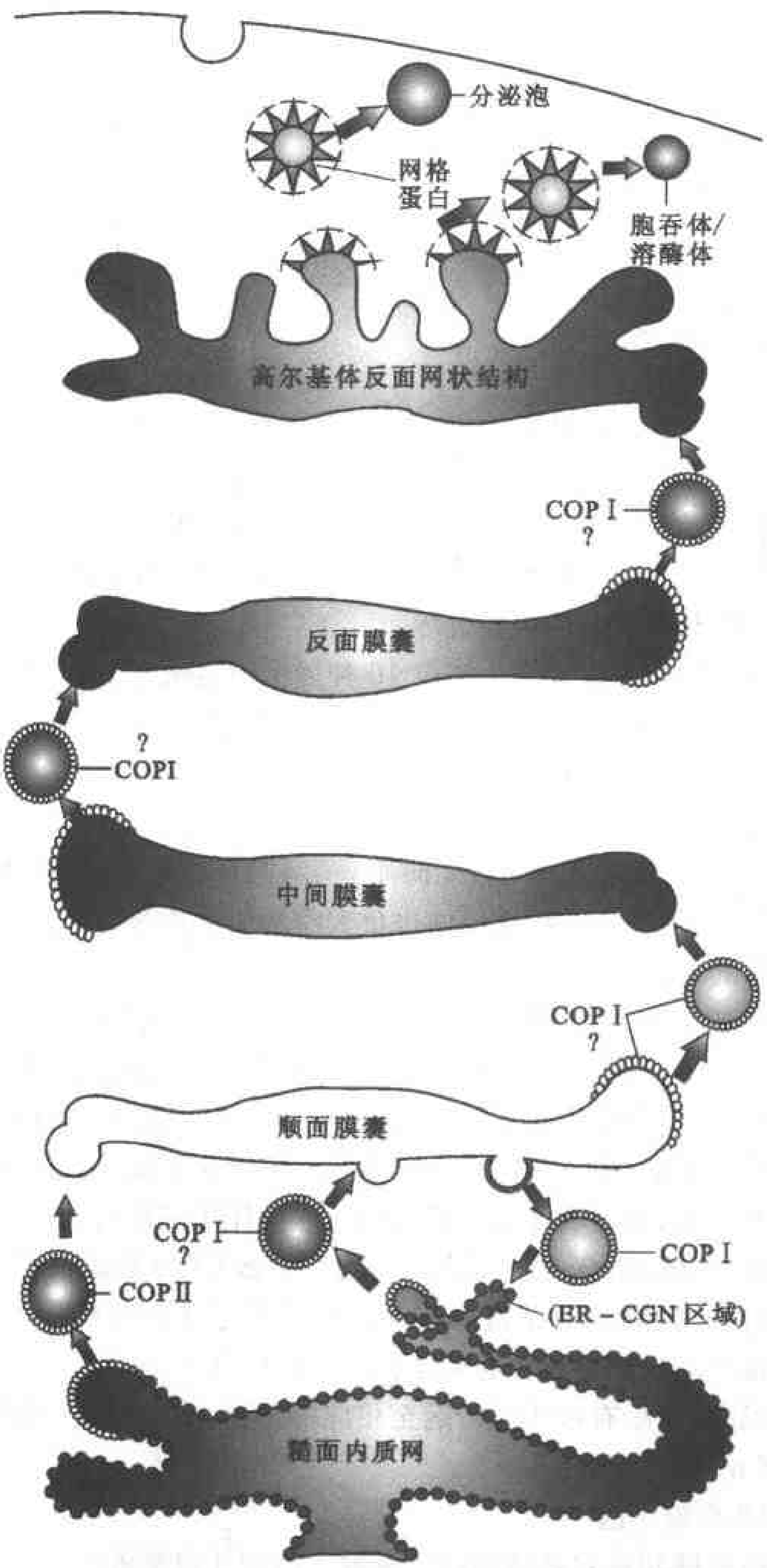


图 6－19　在细胞合成与分泌途径中不同膜组分之间三种不同的膜泡运输方式

网格蛋白有被小泡介导从高尔基体 TGN 向质膜、胞内体的及溶酶体的运输；COPⅡ有被小泡介导从内质网向高尔基体的运输；COPⅠ有被小泡负责将蛋白从高尔基体返回内质网；在从内质网到高尔基体和/或从高尔基体的顺面膜囊到反面膜囊的物质转运中也可能涉及到 COPⅠ有被小泡(物质沿胞吞途径的转运未表示在图中)

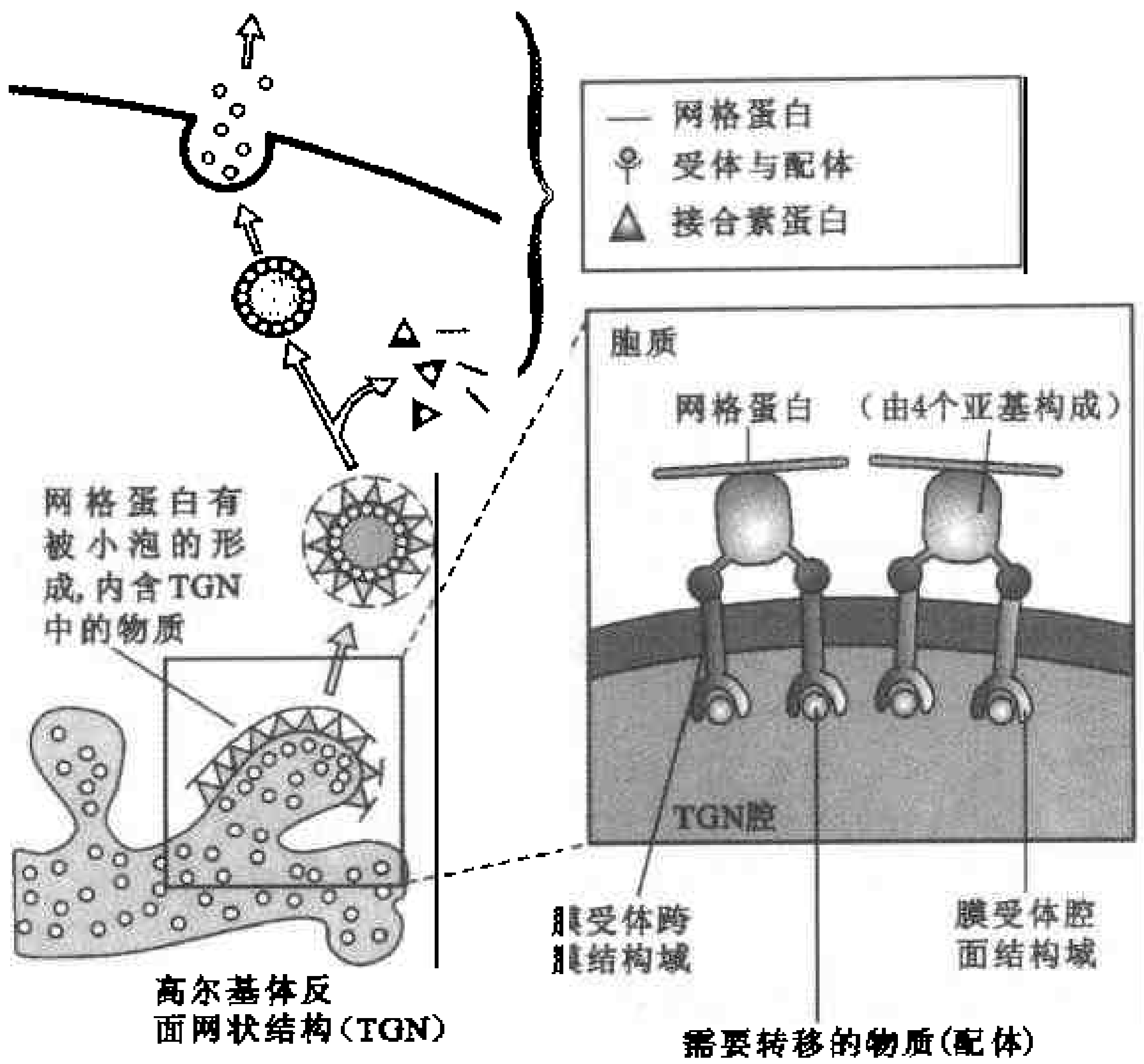


图 6-20 在高尔基体 TGN 区网格蛋白有被小泡形成的示意图

腔面一端作为受体与 ER 腔中的可溶性蛋白(如分泌蛋白)结合。

在 COPⅡ包被蛋白中,Sar 蛋白是一种小的 GTP 结合蛋白,和其他 GTP 结合蛋白一样,它也作为分子开关而起调节作用,主要是调节膜泡包被的装配与去装配。当 Sar 蛋白与 GDP 结合时,处于非活化状态,当 GDP 被 GTP 取代,则激活 Sar 蛋白并导致它与内质网膜的结合,同时引发其他包被蛋白组分在 ER 膜上装配、出芽,随即形成 COPⅡ有被小泡(图 6-21)。在膜泡转运与靶膜融合之前,由结合的 GTP 水解促使包被蛋白发生去装配,产生 Sar-GDP 复合物并释放到细胞质基质中,从而降低对小泡膜的亲和性,Sar-GDP 解离,伴随其他 COPⅡ亚基释放。

3. COPⅠ有被小泡

负责回收、转运内质网逃逸蛋白(escaped proteins)返回内质网。早期研究表明,在糙面内质网中合成的蛋白质,除了某些具有特殊标志的蛋白驻留在内质网或高尔基体中或选择性地进入溶酶体和调节性分泌泡外,其余的蛋白主要是通过一种称为 default pathway 的方式来完成蛋白质的转运过程,即沿着糙面内质网→高尔基体→分泌泡→细胞表面这一途径完成其转运过程。在这种组成型分泌过程中,COPⅠ有被小泡在非选择性的批量运输(bulk flow)中行使功能。

COPⅠ有被小泡首先被分离鉴定,用不能被水解的 GTP 类似物(GTP analogues)处理细胞,将引起 COPⅠ有被小泡在细胞中聚集,并通过密度梯度离心法可将其从细胞匀浆中分离出来,分析发现 COPⅠ包被含有 8 种蛋白亚基,其中

ARF,类似 Sar 蛋白,是一种调节膜泡转运的 GTP 结合蛋白,包被蛋白复合物(coatomer)的装配与去装配依赖于 ARF;此外,ARF 也参与网格蛋白有被小泡的装配调节。

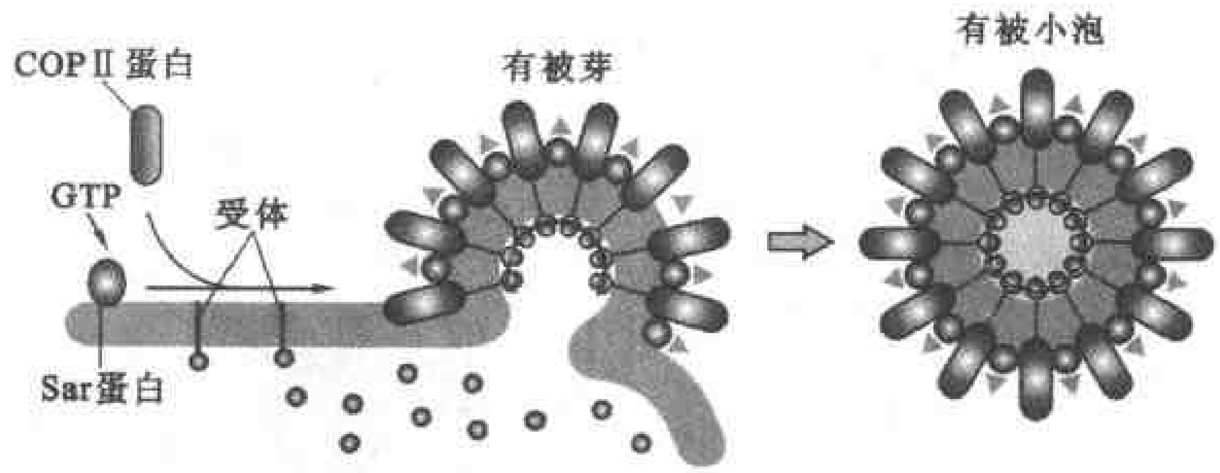


图 6-21　COPⅡ有被小泡的装配

Sar-GTP 与内质网膜受体的结合起始 COPⅡ亚基的装配,形成小泡的包被并出芽,跨膜受体在腔面捕获并富集被转运的可溶性蛋白

在组成型分泌途径中,如果从供体膜组分连续出芽形成转运小泡,那么每种细胞器何以保留它特殊的组成? 又是什么因素决定一种特异蛋白是否被保留在内质网或进入高尔基体? 已有研究证据显示,细胞器中的蛋白质是通过两种机制保留及回收来维持的:一是转运泡将应被保留的驻留蛋白排斥在外,例如有些驻留蛋白参与形成大的复合物,因而不能被包装在出芽形成的转运泡中,结果被保留下来;二是对逃逸蛋白的回收机制,使之返回它们正常驻留的部位。逃逸的内质网蛋白的回收是通过回收信号介导的特异性受体完成的,这类受体能以 COPⅠ有被小泡的形式捕获逃逸分子,并将它们回收到内质网。现已发现,内质网的正常驻留蛋白,不管在腔中还是在膜上,它们在 C 端含有一段回收信号序列(retrieval signals),如果它们被意外地逃逸进入转运泡从内质网运至高尔基体 CGN,则 CGN 区的膜结合受体蛋白将识别并结合逃逸蛋白的回收信号,形成 COPI 有被小泡将它们返回内质网。内质网腔中的蛋白,如蛋白二巯键异构酶和协助折叠的分子伴侣,均具有典型的回收信号 Lys - asp - glu - leu(or KDEL)。如果一个内质网的蛋白缺乏这种序列(KDEL),那么这种蛋白将不能返回内质网,而是被转运泡带到质膜。相反,如果通过重组 DNA 技术方法使表达的溶酶体蛋白或分泌蛋白含有一段附加的 KDEL C 端,那么这种蛋白将返回内质网,而不是被转运至溶酶体或分泌泡。内质网的膜蛋白(如 SRP 受体)在 C 端有一个不同的回收信号,通常是 KKXX(K:lysine,X:任意氨基酸),同样可保证它们的回收(图 6-22)。在生物合成途径中,每种膜组分也许都具有它自己独特的回收信号,这有助于解释任凭转运泡在特定区域内外不断运动,但每种细胞器仍可保持它独特的蛋白质组成。

研究观察表明,膜泡转移不仅沿内质网→高尔基体方向进行顺行转运(anterograde transport),也可沿相反方向进行逆行转运(retrograde transport)。

有证据表明，COPI 有被小泡除行使高尔基体→内质网逆行转运外，也可行使从内质网→高尔基体的顺行转运，以至通过高尔基体的不同分区。按最近的研究，COP Ⅰ 有被小泡首先是将物质从内质网转运到 ER－Golgi 中介组分(intermediate compartment，IC)，然后 COP Ⅰ 有被小泡再将物质从 IC 转运到高尔基体。

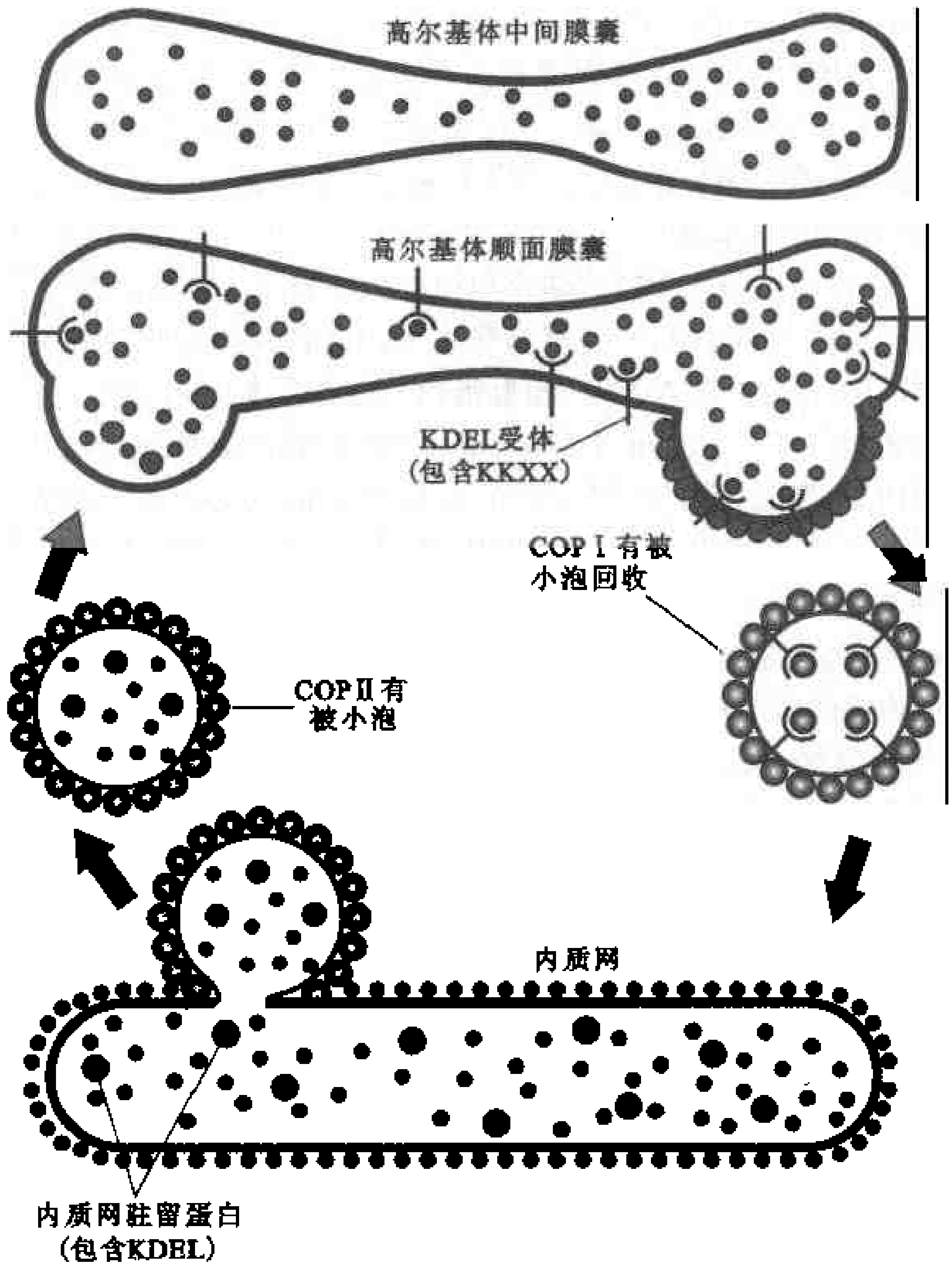


图 6－22 内质网驻留蛋白的回收图解

膜泡转移过程是十分复杂的，在酵母中至少发现 25 种以上与膜泡转移有关的基因。某些基因已分离出来，如对 *sec4* 基因的核苷酸序列分析表明，它编码一种属于 Rab 家族的 GTP 结合蛋白，其作用是在非网格蛋白有被小泡去包被过程中起调节作用。在哺乳动物细胞中分离的高尔基体膜囊在体外与胞质溶胶和 ATP 一起温育可观察到非网格蛋白有被的小泡从膜囊边缘出芽及转运现象，这一结果提示，在体外重建高尔基体的非细胞转运体系的可能性。体外研究结果

表明,囊泡出芽是主动的自我装配过程,所需要的成分在进化中非常保守。因为从酵母或植物细胞中提出的胞质溶胶同样可以启动动物细胞高尔基体的出芽过程。

运输小泡的形成、转运及与靶膜的融合是一个特异性过程,涉及多种蛋白识别、装配、去装配的复杂调控。首先,膜泡融合的特异性表现在一个源于内质网的膜泡与 cis 面高尔基体管网区(CGN)融合,而不会与中间膜囊融合。同样,源于中间膜囊的出芽膜泡只与反面膜囊融合。选择性融合是保证细胞内定向膜流的因素之一。有些相关蛋白已被分离,特别是从神经细胞中分离出参与特异性的膜泡锚定和融合的蛋白组分,如神经元突触前质膜含有一种 syntaxin 蛋白,能与突触小泡膜上的 VAMP(vesicle-associated membrane protein)特异性地结合,这两种蛋白的相互作用介导膜的融合和神经递质的释放。尽管酵母与哺乳类在进化上已有 10 亿年的分歧,而且酵母细胞也没有任何突触传递的功能活性,但却具有编码与 syntaxin 和 VAMP 相似蛋白的基因家族。syntaxin 和 VAMP 是 SNAREs(soluble NSF attachment protein receptor)蛋白家族的一对成员,负责介导真核细胞内的膜泡运输(NSF:N－ethylmaleimide-sensitive factor,具 ATP 酶活性)。VAMP 类似蛋白是 v－SNARE 家族的成员,定位于转运泡的膜上。syntaxin 类似蛋白是 t－SNARE 家族的成员,定位在靶膜上。通过 v－SNARE 与 t－SNARE 两类蛋白间互补性而相互作用,决定膜泡的锚定与融合。按照这种设想,从内质网衍生来的膜泡上的 v－SNARE 将结合高尔基体 CGN 上的 t－SNARE,而不是结合溶酶体膜上的 t－SNARE(图 6－23)。近年来,已分离并鉴定 10 多种这两类蛋白家族的成员并在细胞内定位。参与膜泡融合调节作用的其他一些蛋白也被发现,包括一个大的 GTP 结合蛋白家族(Rab 蛋白家族)。

在细胞的膜泡运输中,糙面内质网相当于重要的物质供应站,而高尔基体是重要集散中心。由于内质网的驻留蛋白具有回收信号,即使有的蛋白发生逃逸,也会保留或回收回来,所以有人将内质网比喻成“开放的监狱”(open prison)。既然高尔基体在细胞的膜泡运输及其随之而形成的膜流中起枢纽作用,那么高尔基体在细胞中的位置如何确定,高尔基体本身的特定成分又是如何保持的呢?对高尔基体特征蛋白进行免疫标记,可观察到高尔基体聚集在微管组织中心(MTOC)附近。在有丝分裂过程中用秋水仙素(colchicine)降解微管后,高尔基体也裂解成若干小囊泡分散在细胞质中。当微管再形成时,囊泡沿微管移向 MTOC,重新形成高尔基体,这种运动方式与内质网相反,推测在高尔基体膜囊上结合有类似动力蛋白的蛋白质,从而使高尔基体靠近中心体,并维持其极性。高尔基体不同的膜囊具有各自不同的成分。同样,内质网、溶酶体、分泌泡和细胞膜及胞内体也都具有各自特异的成分,这是行使复杂的膜泡运输功能的物质基础,但是在膜泡中又必须保证各细胞器和细胞间隔本身成分特别是膜成分的相对恒定。例如 SRP 受体仅存在于内质网膜上,而特定的糖苷转移酶和寡糖加工酶仅存在于一定的高尔基体膜囊上。然而由内质网合成的蛋白质,其中包括膜蛋白,在通过高尔基体的转运与分选过程中经历了多次囊泡形成和与特定的

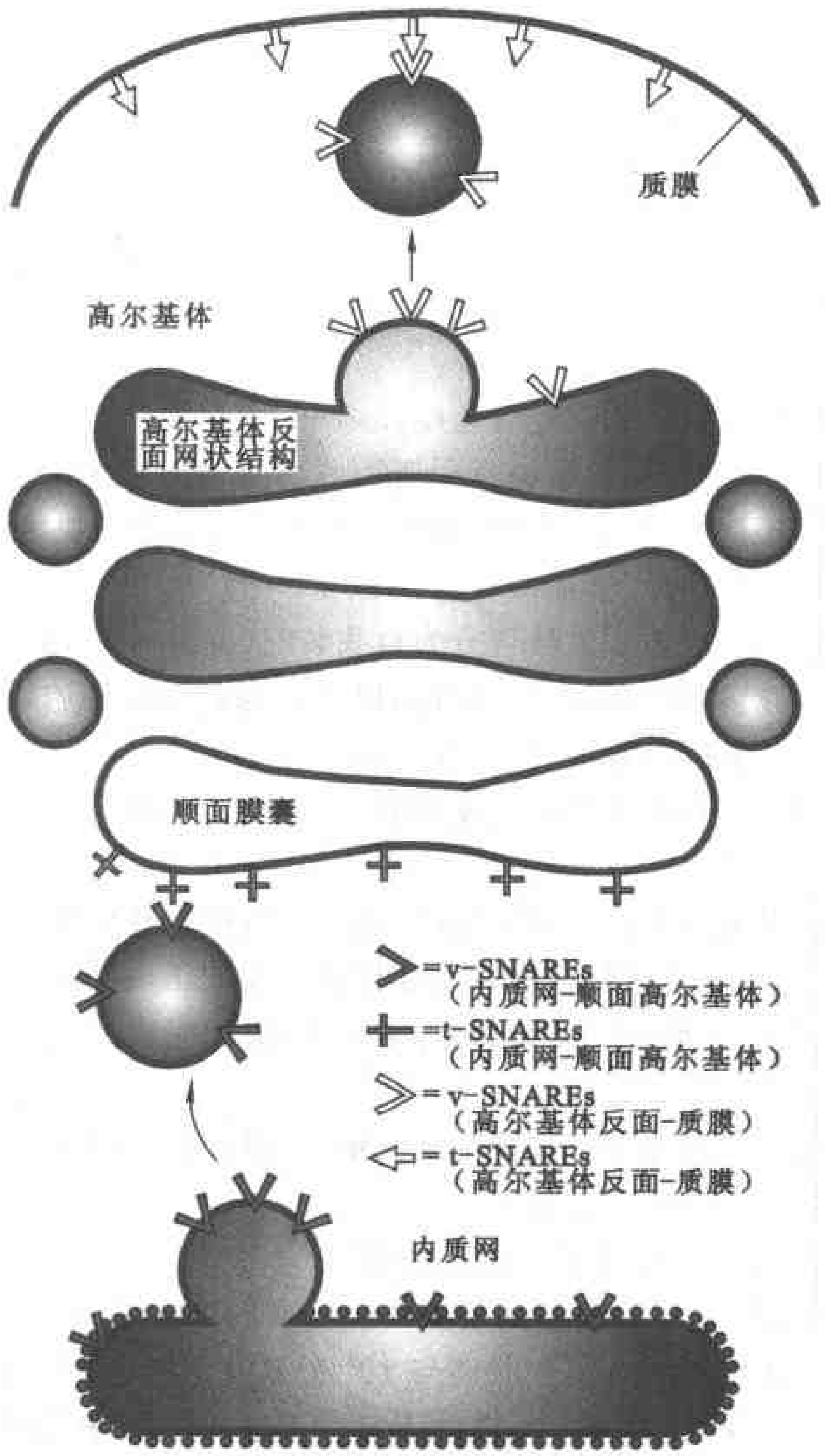


图 6-23　膜泡锚定与融合的特异性是通过转运泡膜上的蛋白和靶膜上的蛋白相互作用获得的

靶膜融合过程，推测每一步可能都是通过信号与特异受体的相互作用来完成的。蛋白分子上某些信号可使其长期驻留在内质网或高尔基体中。另一些信号可使蛋白质不断地从一个间隔转移到另一个间隔。因此，很多蛋白分子的表面可能含有多种用于转移与分选的信号。转运小泡形成或出芽主要发生在膜的特异部位，即蛋白信号与受体结合的部位。某些有包膜病毒的出芽释放可看成是膜泡转移的一种特例。成分分析表明，在病毒的包膜中几乎不含有宿主细胞的膜蛋白而仅含有病毒的包膜蛋白。如果把病毒包膜蛋白看成膜上受体，那么可以认为正是病毒核壳上的信号与受体的相互作用，排除了细胞质膜上的其他多种膜蛋白。在细胞内的出芽或内吞过程及膜融合过程中，除受体外究竟有多少膜蛋

白会从一个细胞间隔进入另一个细胞间隔中，目前还不清楚。但实验表明，受体蛋白可以返回原来的膜结构中，如从高尔基体的顺面膜囊返回内质网，从溶酶体返回至高尔基体的 TGN 以及从受体介导的胞饮泡返回到细胞膜上。显然这有利于维持特定膜成分的相对恒定。

四、细胞结构体系的装配

蛋白质等生物大分子如何逐级装配(assembly)并最终形成赖以进行生命活动的细胞结构体系，这是当前生物学中所面临的基本问题之一。虽然分子生物学、结构生物学以及生物技术的快速发展为回答上述问题提供了可能性，但这一问题还远没有得到解决。

生物大分子的装配方式大体可分为自我装配(self-assembly)、协助装配(aided-assembly)和直接装配(direct-assembly)以及更为复杂的细胞结构及结构体系之间的装配。有些装配过程需 ATP 或 GTP 提供能量。

自我装配的信息存在于装配亚基的自身，当然也不排除细胞提供的装配环境，如 pH、离子浓度等。

协助装配在其装配过程中，除需要形成最终结构的亚基外，还需要其他成分的介入，或对装配的亚基进行修饰以保证行使装配的正确功能，如 T4 噬菌体装配时需要一种脚手架蛋白(scaffolding protein)，装配完成后，这种蛋白离开 T4 噬菌体头部。

直接装配是指某种亚基直接装配到已形成的结构上，如细胞膜成分的装配。

装配具有重要的生物学意义：

1. 减少和校正蛋白质合成中出现的错误

同 DNA 与 RNA 合成一样，如果蛋白质合成的错误率为 10^{-3}，那么合成一个由 10^4 个氨基酸残基组成的多肽链与 10^2 个氨基酸残基的多肽链相比，前者只有 0.01% 的多肽链是准确无误的，而后者可高达 90%。并且在装配过程中装配校正机制可进一步排除畸形的亚单位。

2. 可大大减少所需的遗传物质信息量

如前所述，编码 10^2 个氨基酸残基多肽链 DNA 长度比编码 10^4 个氨基酸残基多肽链 DNA 长度相差 2 个数量级。

3. 通过装配与去装配更容易调节与控制多种生物学过程

当然，装配方式也存在不足之处，因此，细胞内并非所有的复杂结构都是由小亚基装配的。除 DNA 外，还存在一些大的单链分子。

当人们试图从分子水平来研究并解释生命现象及其本质时，越来越多的实验证据表明某一种酶或某一代谢反应环节仅仅表现出一定的生物活性，它固然是生命活动的基础，然而对生命现象的了解尚须在更高的细胞结构层次上进行。事实上细胞内许多代谢活动往往是以蛋白质与蛋白质，蛋白质与核酸，蛋白质与磷脂等装配成特定的复合物。这些复合物构成了细胞结构体系的结构基础与功

能单位。如在遗传信息结构体系中，人们已熟知的DNA与组蛋白装配成的核小体(nucleosome)是染色质结构的基本单位，rRNA与核糖体(ribosome)蛋白装配成的核糖体是蛋白质合成的结构单位，在进行蛋白质合成时又进一步与mRNA组成多聚核糖体(polysome)。多聚核糖体还要与膜系统(如内质网)或骨架系统(如微丝或中间纤维)相结合形成更为复杂的结构。只有这样合成的蛋白才能正确地折叠、装配和运转，并受控于整个细胞代谢活动而参与细胞的生命活动。相比之下，在试管的非细胞体系中合成的蛋白，即使其一级结构与之完全相同，但在蛋白的折叠、修饰加工、运转以及合成的时相和调控等方面均无法与在有序的细胞内时相比，因此可以说在试管内仅仅是一定生物活性的表现。

随着分子生物学研究的深入，人们更多地注意到这类反应复合物的装配及其功能。有些已赋予新的名称用于强调它在代谢中的重要性，如DNA复制起始复合物(primosome)。mRNA剪接复合物(spliceosome)，胞质中降解没有装配的或其他蛋白的复合物(proteosome)等等。至于糖酵解和三羧酸循环的酶系，电子传递链和光系统等都是在不同程度上装配成的反应复合物，而它们又以各种方式与不同的骨架系统或膜系统相结合发挥其在生命活动中的作用。

膜系统的装配特别是膜围绕的细胞器的装配是更高一个层次上的装配。膜围绕的细胞器大体分为两类：一类是与细胞内膜系统相关的，如内质网、高尔基体、溶酶体、胞内体等细胞器，目前已有较多的了解；另一类是含有遗传物质DNA的细胞器，即线粒体和叶绿体，细胞核可看作为最大、最为复杂的细胞器。细胞器的装配同样涉及蛋白与蛋白、蛋白与核酸、蛋白与膜脂的装配。其运输和装配过程与方式更为复杂。线粒体与叶绿体的装配还涉及自身的基因产物与细胞核基因产物之间的协调等复杂调控过程，其装配的突出特点是不能重新装配形成线粒体与叶绿体，而只能在已有线粒体与叶绿体(或前体)的基础上进行。

在细胞有丝分裂过程中，绝大多数的细胞器经历去装配和重装配的过程，其中以细胞核的变化最为明显，如核膜与核纤层的装配，核孔复合体的装配，核仁的装配。染色体去凝集与在核内重新排布以行使基因复制与转录功能，也可看作是一种自身及其与核基质等成分重新装配，以便行使其功能的结构形成的过程。细胞核体外重建技术，为研究细胞核的装配过程与机制提供了一个较为理想的模型。相形之下，线粒体与叶绿体的装配特别是与细胞核的调控关系的研究，还在试图寻找各种突变株或理想研究模型的阶段。某些病毒的装配与成熟过程可望成为研究细胞结构体系装配某些环节的模型。

在间期细胞中，随着细胞周期进程中的物质更新，细胞结构与细胞器的增殖和更新以及细胞代谢状态的不同，细胞结构体系的装配其中包括细胞骨架的装配与去装配，质膜的装配与去装配以及某些细胞器的装配与去装配，都伴随整个细胞周期的进程而进行。因此研究细胞结构体系的装配与去装配对了解细胞的生长分化、衰老和凋亡以及细胞的信息传递与应答是十分重要的。

细胞结构体系之间的相互关系是细胞结构体系装配的更高的一个层次，正是各结构体系之间的相互协同与配合，才表现出整体细胞的生命活动。细胞骨

架体系在整个细胞结构体系中起了重要的组织作用。一方面它起到支持和联系使整个细胞结构体系成为结构与功能上统一整体的作用;另一方面它也像膜系统一样提供了很大的表面积,并通过细胞质基质与核基质(nuclear matrix)进一步使细胞结构区域化分布。目前对构成细胞质内骨架系统的基本成分及其装配已有较多的了解,但对其在细胞质中的组织作用以及与膜系统的相互关系尚了解不多,至于核基质的成分与装配,核基质与染色体及染色体骨架的关系等则了解更少。此外骨架系统的组织作用往往是通过它在装配与去装配的动态过程中实现的,这些无疑都增加了研究的难度。

分子生物学的成就与手段使我们有可能着手解决上述的难题。然而如将细胞结构体系的装配与不断变化的细胞整体一起考虑,就会发现在这一复杂系统中,决定的因果关系和叠加原则,将会遇到难以克服的困难。即细胞结构体系装配与去装配的动态过程不能简单归于分子水平的活动。因此在分子水平研究基础上借助于新的整体思维的理论与方法,可能会使这一难题的研究特别是在高层次结构体系的装配的研究中取得突破性的进展。

决定新合成的多肽转移到细胞的哪个部位的信息存在于多肽的本身,如信号肽决定细胞质基质中开始合成的蛋白质转移到内质网膜上。而缺少信号肽的多肽,只能在细胞质基质中完成蛋白质合成,然后再根据自身的信号转移到细胞的其他部位。除此之外,新合成的多肽会遇到如何正确地折叠成为有功能的蛋白质这一重要问题。同样,决定一条多肽如何正确折叠,何时折叠,甚至有些多肽还需要重新折叠等,这些信号也存在于蛋白质氨基酸的一级结构中。还有的多肽含有进一步加工或装配成寡聚体的信息。然而只凭这些信号本身并不能保证新合成的多肽正确地转移、折叠或装配。特别是在复杂的蛋白质和其他分子含量极高的细胞内环境中,多肽正确地转移、折叠或装配会更加困难。现已证明,细胞中的某些蛋白质分子可以识别正在合成的多肽或部分折叠的多肽并与多肽的某些部位相结合,从而帮助这些多肽转运、折叠或装配,这一类分子本身并不参与最终产物的形成,因此称为“分子伴侣”(molecular chaperones)。信号识别颗粒就是一种“分子伴侣”,它可与信号肽结合,帮助多肽转运,又可防止新生肽畸变或成熟前折叠或装配。热休克蛋白中 Hsp70 家族的蛋白(相对分子质量 $70\times10^3\sim80\times10^3$)帮助多肽转移和多肽复合物的装配,在热休克条件下还可作用于蛋白质的多聚物;还有 Cpns60 这一类的分子伴侣蛋白,其中包括线粒体中的 Hsp60(相对分子质量为 $58\times10^3\sim65\times10^3$,由 14 个亚单位组成),它在新合成的蛋白质向线粒体中的转移与折叠及在热休克状态下都起着重要作用。

提　要

已有的证据显示,细胞质基质可能是一个高度有序且又不断变化的结构体系,细胞骨架纤维贯穿其中。多数的中间代谢反应及蛋白质合成与转运发生在细胞质基质中。某些蛋白质的修饰和选择性地降解等过程也在细胞质基质中进

行。人们越来越多地注意到作为细胞质基质的主体结构——细胞骨架纤维的结构与功能以及整个细胞质基质，在保证各种代谢反应的进行与相互协调和在细胞内复杂的物质运输与信息传递过程中所起的重要作用。

内质网是蛋白质与膜脂合成的基地。糙面内质网主要合成分泌性蛋白、膜蛋白及内质网、高尔基体和溶酶体中的蛋白质。多肽的糖基化及其折叠与装配也发生在内质网中，肽链上的信号序列决定了多肽在细胞质中的合成部位，并最终决定成熟蛋白的去向。分子伴侣在这些过程中起重要作用。膜脂在光面内质网的细胞质基质膜面上合成，随后部分膜脂转移到内质网腔面膜上，进而通过出芽的方式或磷脂转换蛋白的协助，运送到其他部位。

高尔基体是一种有极性的细胞器，由互相联系的几个部分组成，即高尔基体的顺面网状结构与膜囊、中间膜囊、反面膜囊和反面网状结构。高尔基体在蛋白质的加工、分选、包装与运输以及在细胞内的"膜流"中起重要作用。此外，蛋白的糖基化及其复杂的加工与修饰，多肽的酶解加工以及多糖的合成等也发生在高尔基体中。对溶酶体发生过程的认识有助于了解高尔基体完成其分选功能的作用机制。

溶酶体中含有多种酸性水解酶类，主要的功能是进行细胞内的消化作用。由于溶酶体功能缺陷而引起的多种病症，使人们越来越多地关注与研究溶酶体在细胞内的清道夫作用。某些细胞的溶酶体还具有防御功能和其他重要的生理功能。过氧化物酶体与溶酶体一样是一种异质性的细胞器，但在酶的种类、功能和发生等方面都与溶酶体有很大区别，在植物细胞中它参与光呼吸作用和乙醛酸循环反应，对动物细胞中过氧化物酶体的功能了解不多。

绝大多数的蛋白质均在细胞质基质中开始合成，随后，或在细胞质基质中或运至糙面内质网上继续合成。然后，通过不同的途径转运到细胞的特定部位，这一过程称为蛋白质的分选或定向运转。其指令存在于多肽自身，继信号假说提出与确证后，人们又发现了一系列的信号序列，指导蛋白的定向运转。然而，最令人兴奋的进展还是对膜泡运输的方式(其中包括网格有被小泡，CopⅡ有被小泡和CopⅠ有被小泡等)与作用机制的了解。

蛋白质的装配与去装配不仅存在于蛋白质分选的过程中，而且普遍存在于整个细胞生命活动中，具有重要的生物学意义。分子伴侣在蛋白质分选与装配的某些环节中起重要作用。

思 考 题

1. 谈谈你对细胞质基质的结构组成及其在细胞生命活动中作用的理解。
2. 比较糙面内质网和光面内质网的形态结构与功能。
3. 细胞内蛋白质合成部位及其去向如何？
4. 糙面内质网上合成哪几类蛋白质？它们在内质网上合成的生物学意义又是什么？
5. 指导分泌性蛋白在糙面内质网上合成需要哪些主要结构或因子？它们如何协同作用

完成肽链在内质网上的合成？

6. 结合高尔基体的结构特征，谈谈它是怎样行使其生理功能的。

7. 蛋白质糖基化的基本类型、特征及生物学意义是什么？

8. 溶酶体是怎样发生的？它有哪些基本功能？

9. 过氧化物酶体与溶酶体有哪些区别？怎样理解过氧化物酶体是异质性的细胞器？

10. 图解说明细胞内膜系统的各种细胞器在结构与功能上的联系。

11. 何谓蛋白质的分选？已知膜泡运输有哪几种类型？

12. 怎样理解细胞结构装配的生物学意义？

参考文献

1. Aviel G Loewy, Philip Siekevitz, John R Menninger and Jonathan A N Gallant. Cell Structure and Function. Saunders College Publishing, 1991

2. David S Goodsell. Inside a Living Cell. TIBS, 16, 203～206, 1991

3. Harvey Lodish *et al*. Molecular Cellular Biology. New York and Oxford: Scientific American Books, Inc., 1995

4. Ralf Erdmann, Marfen Veenhuis and Wolf－H. Kunau. Peroxisomes: organelles at the Crossroads. Trends in cell Biology, Vol 7(10), 1997

5. Bruce Alberts *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publishing, Inc., 1998

6. Marilyn G Farquhar, George E Palade. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. Trends in Cell Biology, 2～10, 1998

第七章

细胞的能量转换——线粒体和叶绿体

生物的基本能量来源是太阳光的辐射能，但生物体不能直接利用太阳光的辐射能，必须先使之转换为化学能，再为生物体利用。这种能量的转换是在植物细胞的叶绿体和蓝藻的光合片层中进行的。叶绿体通过光合作用把光能转换为化学能，并储存于糖类、脂肪和蛋白质等大分子有机物中。而不具叶绿体的动物细胞则以植物合成的有机物为营养，通过分解代谢取得能量。线粒体是一种高效地将有机物转换为细胞生命活动的直接能源 ATP 的细胞器。

很明显，线粒体和叶绿体是细胞内的两种产能细胞器。线粒体普遍存在于各类真核细胞中，而叶绿体仅存在于植物细胞中。它们的形态特征主要是封闭的双层单位膜结构，且内膜经过折叠并演化为表面积极大扩增的内膜特化结构系统。内膜在能量转换功能中起着主要作用。大量扩增的内膜不仅为线粒体的氧化磷酸化和叶绿体的光合磷酸化反应提供了结构框架。而且，它围成了一个包含能催化细胞其他生命化学反应的多种酶的内腔（基质）。

线粒体和叶绿体都是高效的产生 ATP 的精密装置。尽管它们最初的能量来源有所不同，但却有着相似的基本结构，而且以类似的方式合成 ATP。ATP 是细胞生命活动的直接供能者，也是细胞内能量的获得、转换、储存和利用等环节的联系纽带。

线粒体和叶绿体都具有环状 DNA 及自身转录 RNA 与翻译蛋白质的体系。很多学者把线粒体和叶绿体的遗传信息系统称为真核细胞的第二遗传信息系统，或称核外基因及其表达体系。虽然线粒体和叶绿体具有自己的遗传物质和进行蛋白质合成的全套机构，但组成线粒体和叶绿体的各种蛋白质成分则是由核 DNA 和线粒体 DNA 或叶绿体 DNA 分别编码的。所以线粒体和叶绿体都是半自主性的细胞器。

第一节　线粒体与氧化磷酸化

线粒体是真核细胞内一种重要和独特的细胞器。人体内的细胞每天要合成几千克的 ATP，且 95% 的 ATP 是由线粒体中的呼吸链所产生，因此，线粒体被

称为细胞内的"能量工厂"(power plants)。线粒体通过氧化磷酸化作用,进行能量转换,为所需要的细胞进行各种生命活动提供能量。

1890 年,德国生物学家 Altmann 首先在光学显微镜下观察到动物细胞内存在着一种颗粒状的结构,称作生命小体(bioblast)。1897 年 Benda 重复了以上实验,并将之命名为线粒体(mitochondrion,源于希腊字 mito:线,chondrion:颗粒)。1904 年 Meves 在植物细胞中也发现了线粒体,从而确认线粒体是普遍存在于真核生物所有细胞中的一种重要细胞器。1900 年 Michaelis 用詹纳斯绿 B(Janus green B)对线粒体进行活体染色,并证实了线粒体可进行氧化还原反应。1912 年 Kingsbury 第一个提出线粒体是细胞内氧化还原反应的场所。1913 年 Engelhardt 证明磷酸化和氧的消耗偶联在一起。1943—1950 年,Kennedy 和 Lehninger 进一步证明,柠檬酸循环、氧化磷酸化和脂肪酸氧化均发生在线粒体内。其后,Lehninger 又发现氧化磷酸化需要电子传递。1952—1953 年,Palade 和 Sjostrand 各自利用电镜技术观察到线粒体的精细结构,1963—1964 年又确定线粒体内有 DNA 存在,从而在分子水平上对线粒体的结构及其功能有了较全面而深人的认识。

一、线粒体的形态结构

(一) 线粒体的形态、大小、数量和分布

线粒体的形态、大小、数量与分布,在不同细胞内变动很大,就是同一细胞在不同生理状态下也不一样。线粒体在生活细胞中具有多形性、易变性、运动性和适应性等特点。其形状多种多样,但以线状和颗粒状最常见,也可呈环形、哑铃形、枝状或其他形状。在一定条件下线粒体的形状变化是可逆的。线粒体一般直径为 0.5～1.0μm,长 1.5～3.0μm。其大小也因细胞种类和生理状况的不同而不一样。例如,大鼠肝细胞的线粒体可长达 5μm;在胰腺的外分泌细胞中可观察到巨大线粒体,长达 10～20μm;人的成纤维细胞线粒体甚至可长达 40μm。线粒体的形状与大小并不是固定的,而是随着代谢条件的不同而改变,它可能反映线粒体处于不同的代谢状态。

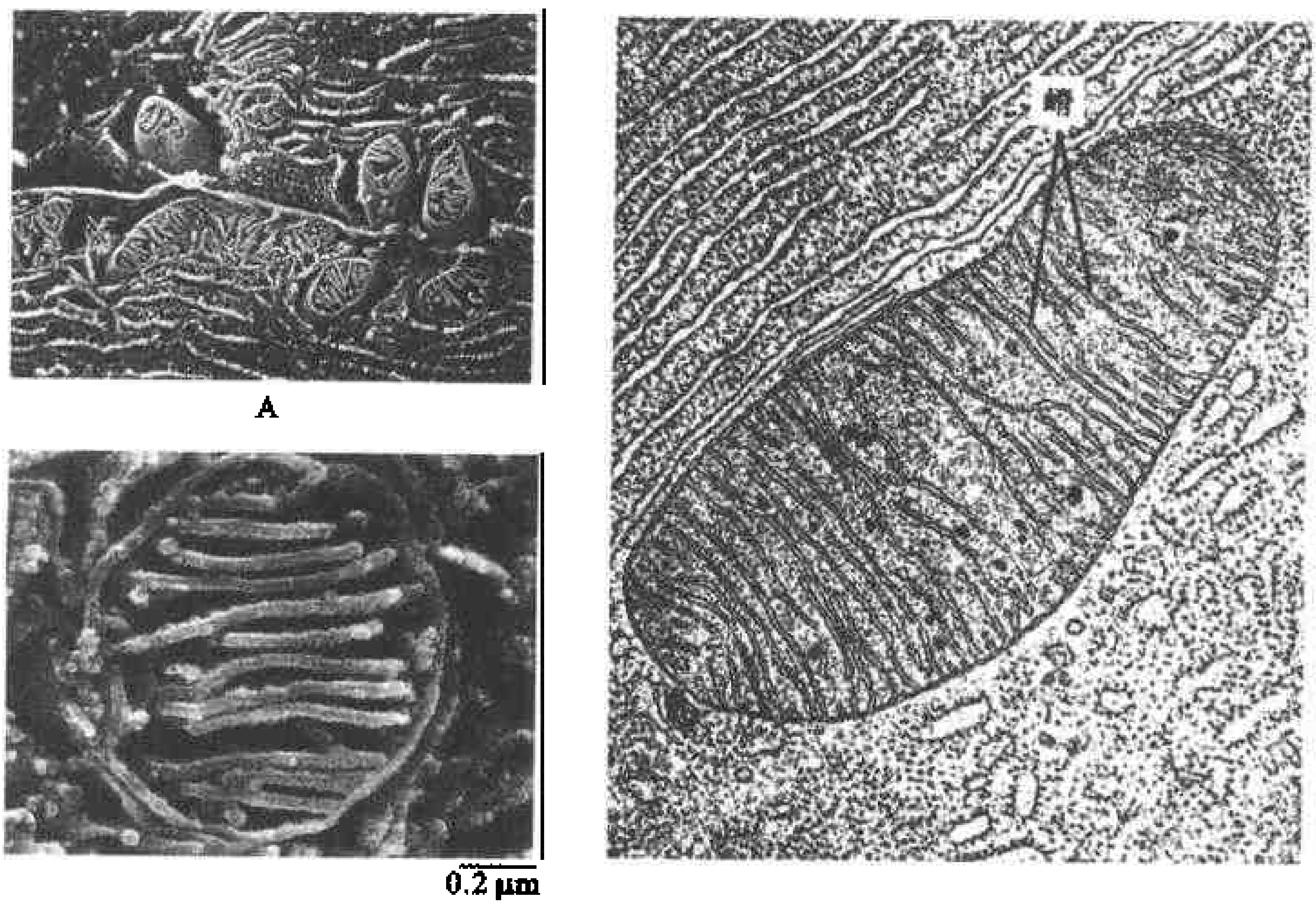
一般动物细胞内线粒体的数目由数百到数千个不等,肝细胞内约有 1 700 个左右。植物细胞的线粒体数量一般较动物细胞的少。线粒体的数目在不同类型细胞内有很大差别,许多哺乳动物成熟的红细胞缺少线粒体;利什曼原虫中只有一个巨大的线粒体;海胆卵母细胞则多达 30 万个;巨大变形虫可高达 50 万个。线粒体的数目还与细胞的生理功能及生理状态有关,在新陈代谢旺盛的细胞中线粒体多,如人和哺乳动物的心肌、小肠、肝等内脏细胞中线粒体很丰富;飞翔鸟类胸肌细胞线粒体的数目比不飞翔鸟类的多;运动员的肌细胞线粒体比不常运动的人的多。

线粒体在细胞内的分布一般是不均匀的,例如,肠上皮细胞中的线粒体呈两极性分布,集中于顶部和基部。根据细胞代谢的需要,线粒体可在细胞质中运

动、变形和分裂增殖,如在玉米的小孢子发育过程中,线粒体定向地运动、聚集与分散,在此过程中绒毡层细胞中线粒体的数量可增加 40 多倍。线粒体往往在细胞代谢旺盛的需能部位比较集中,如分泌细胞的线粒体聚集在分泌物合成的区域;肌细胞的线粒体沿肌原纤维规则排列;精子细胞的线粒体集中在鞭毛中区。线粒体的这种分布显然有利于需能部位的能量供应。线粒体在细胞质中迁移时,往往与微管有关。

(二)线粒体的超微结构

在电镜下观察到线粒体是由两层单位膜套叠而成的封闭的囊状结构。主要由外膜(outer membrane)、内膜(inner membrane)、膜间隙(intermembrane space)及基质(matrix)或内室(inner chamber)4 部分组成(图 7-1)。



A B C

图 7-1 线粒体的电子显微图(转引自 Gerald Karp, 1999)
A、B 扫描电镜照片:示线粒体内部结构;C 透射电镜照片:示线粒体内部结构

1. 外膜

外膜是包围在线粒体最外面的一层单位膜,光滑而有弹性,厚约 6 nm。用磷钨酸负染时,可观察到外膜上有排列整齐的筒状圆柱体,高 5~6 nm,直径 6 nm,其成分为孔蛋白(porin),圆柱体上有直径为 2~3 nm 的小孔。相对分子质量为 10×10^3 以下的小分子物质均可通过小孔进入膜间隙。

2. 内膜

内膜位于外膜内侧,把膜间隙与基质(内室)分开,厚约 6~8 nm。内膜对物质的通透性很低,能严格地控制分子和离子通过,这种"不透性"(impermeabili-

ty)在 ATP 的生成过程中起重要作用。这种特性与内膜的结构组成有关，内膜含有大量的心磷脂(cadiolipin)，形成通透性屏障，如 H^+、ATP、丙酮酸等不能自由透过内膜，必须在载体或通透酶(permease)系统的协助下才能实现跨膜运输。

内膜向线粒体内室褶叠形成嵴(cristae)，嵴使内膜的表面积大大扩增。有人估计，大鼠肝细胞线粒体嵴的表面积比外膜大4倍，这对线粒体进行高速率的生化反应是极为重要的。嵴的形状和数量与细胞种类及生理状况密切相关，需能多的细胞，不但线粒体多，嵴的数量也多。嵴有两种类型：板层状和管状，其他形式的嵴可视为由这两种基本形式衍生而来。在高等动物中，绝大部分细胞线粒体的嵴为板层状，其方向与线粒体长轴垂直，但也有与长轴平行的，如神经细胞，而人的白细胞线粒体的嵴则为分支管状。

用电镜负染色法观察分离的线粒体时，可见内膜和嵴的基质面上有许多排列规则的带柄的球状小体，称为基粒。估计每个线粒体约有 $10^4 \sim 10^5$ 个基粒。基粒由头部和基部组成。头部又称 F_1，为球形、直径 9 nm 的颗粒。基部又称 F_0，嵌入线粒体内膜。

3. 膜间隙

膜间隙是内外膜之间封闭的腔隙，宽约 6～8 nm，其中充满无定形液体，内含许多可溶性酶、底物和辅助因子。嵴内间隙(intracristal space)与膜间隙相通，实际上是膜间隙的延伸。

4. 基质或内室

基质为内膜所包围的嵴外空间，腔内充满可溶性蛋白质性质的胶状物质，呈均质状，具有一定的 pH 和渗透压。

二、线粒体的化学组成及酶的定位

(一) 线粒体的化学组成

线粒体的化学成分主要是蛋白质和脂质。其中蛋白质占线粒体干重的 65%～70%，脂质占 25%～30%。大鼠肝细胞线粒体蛋白质的 67% 在基质内，21% 在内膜，6% 在外膜，6% 在膜间隙。

线粒体的蛋白质可分为可溶性与不溶性两类。可溶性蛋白大多数是基质中的酶和膜的外周蛋白；不溶性蛋白是膜的镶嵌蛋白、结构蛋白和部分酶蛋白。肝细胞线粒体蛋白质有 50%～70% 是可溶的，而牛心肌线粒体中只有 15% 是可溶的，这与嵴的多少有关。用电泳方法分析，线粒体外膜上含有 14 种蛋白质，内膜上含有 21 种蛋白质。

线粒体的脂质主要成分是磷脂，占脂质的 3/4 以上。其中含磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、心磷脂和少量肌醇及胆固醇等。磷脂在内外膜上的组成不同，外膜上主要是磷脂酰胆碱，其次是磷脂酰乙醇胺，磷脂酰肌醇和胆固醇的含量较少。内膜主要含心磷脂，高达 20%，比任何膜的都高，但胆固醇含量极低，这与内膜的高度疏水性有关。

线粒体内、外膜在化学组成上的根本区别是脂质和蛋白质的比值不同，内膜的脂质与蛋白质的比值低(0.3:1)，外膜的比值较高(1:1)。内膜富含酶蛋白和辅酶，外膜仅含少量酶蛋白。

线粒体的基质中含有催化三羧酸循环、脂肪酸 β－氧化、氨基酸氧化、蛋白质合成等有关的上百种酶和其他成分，如环状 DNA、RNA、核糖体及较大的致密颗粒，这些颗粒是含磷酸钙的沉积物，其作用是贮存钙离子，也可结合镁离子。基质中还有许多可溶性代谢中间产物。

(二) 线粒体酶的定位

线粒体约有 140 余种酶，分布在各个结构组分中，其中 37%是氧化还原酶，10%是合成酶，水解酶不到 9%，标志酶约 30 种。线粒体各组成部分所含的酶是不同的，这与各部分的功能有关。

在这些酶中，有的可作为某一部位所特有的标志酶。如外膜的单胺氧化酶，膜间隙的腺苷酸激酶，内膜的细胞色素氧化酶，基质中的苹果酸脱氢酶。线粒体中一些主要酶的分布列于表 7－1。

表 7－1　线粒体主要酶的分布

部位	酶的名称	部位	酶的名称
外膜	单胺氧化酶	膜间隙	腺苷酸激酶
	NADH－细胞色素 c 还原酶(对鱼藤酮不敏感)		二磷酸激酶
	犬尿酸羟化酶		核苷酸激酶
	酰基辅酶 A 合成酶		
内膜	细胞色素 b、c、c_1、a、a_3	基质	柠檬酸合成酶、苹果酸脱氢酶
	ATP 合成酶系		延胡索酸酶、异柠檬酸脱氢酶
	琥珀酸脱氢酶		顺乌头酸酶、谷氨酸脱氢酶
	β－羟丁酸和 β－羟丙酸脱氢酶		脂肪酸氧化酶系、
	肉毒碱酰基转移酶		天冬氨酸转氨酶、
	丙酮酸氧化酶		蛋白质和核酸合成酶系、
	NADH 脱氢酶(对鱼藤酮敏感)		丙酮酸脱氢酶复合物

三、线粒体的功能

线粒体的主要功能是进行氧化磷酸化，合成 ATP，为细胞生命活动提供直接能量。线粒体是糖类、脂肪和氨基酸最终氧化释能的场所。糖类和脂肪等营养物质在细胞质中经过降解作用产生丙酮酸和脂肪酸，这些物质进入线粒体基质中，再经过一系列分解代谢形成乙酰 CoA，即可进一步参加三羧酸循环。三羧酸循环中脱下的氢经线粒体内膜上的电子传递链(呼吸链)，最后传递给氧，生成水。在此过程中释放的能量，通过 ADP 的磷酸化，生成高能化合物 ATP，供机体各种活动的需要。因此氧化磷酸化是细胞获得能量的主要途径(图 7－2)。因而，细胞内线粒体存在的状况往往反映细胞对能量的需要。实验证明，把酵母转至无氧条件下培养，线粒体的数目会减少，大量的嵴会消失，同时，几乎所有的

细胞色素分子消失，线粒体变为很小的无功能的囊泡。如果重新给这些酵母供氧，线粒体又能生成嵴，恢复正常形态，且数量也增加，同时细胞色素也能重新合成，此时细胞活跃增殖。

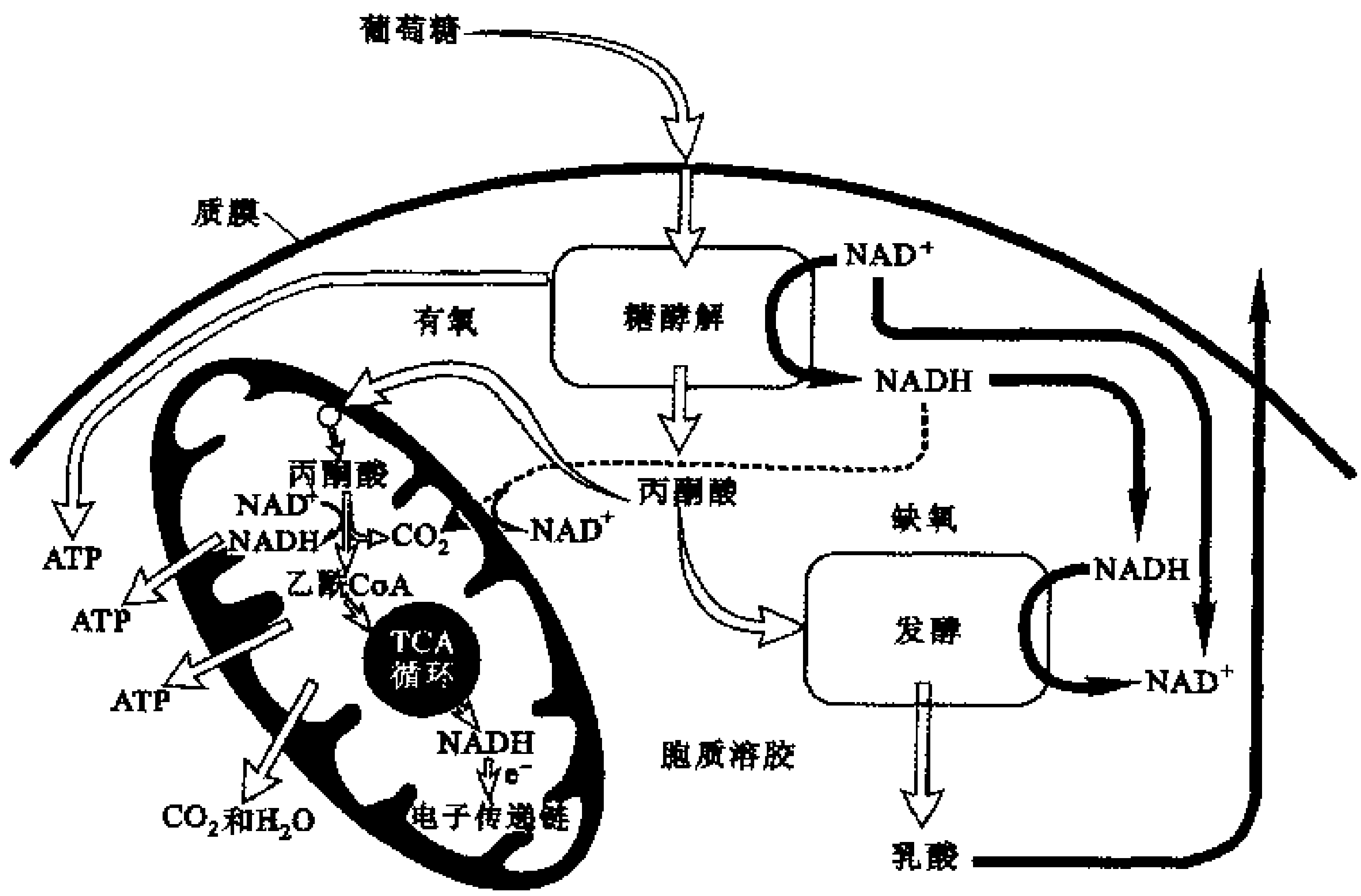


图 7－2　真核细胞线粒体中代谢反应图解(引自 Gerald Karp，1999)

线粒体的功能不仅是为细胞提供 ATP 能量，而且还与细胞中氧自由基的生成、细胞程序性死亡、细胞的信号转导、细胞内多种离子的跨膜转运及电解质稳态平衡的调控包括线粒体对细胞中 Ca^{2+} 的稳态调节等有关。

(一) 氧化磷酸化的分子结构基础

氧化(放能)和磷酸化(贮能)是同时进行并密切偶联在一起的，但却是由两个不同的结构系统实现的。1968 年 E. Racker 等人用超声波将线粒体破碎，线粒体内膜碎片可自然卷成颗粒朝外的小膜泡，这种小膜泡称为亚线粒体小泡(submitochondrial vesicle)或亚线粒体颗粒(submitochondrial particles)(图 7－3)。

这些亚线粒体小泡具有电子传递和磷酸化的功能。如用胰蛋白酶或尿素处理，则小泡外面的颗粒可解离下来，这样的小泡便只能进行电子传递，而不能使 ADP 磷酸化生成 ATP。如果将这些颗粒重新装配到无颗粒的小泡上时，则小泡又恢复了电子传递和磷酸化相偶联的能力。由此可见，由 NADH 脱氢酶至细胞色素氧化酶的整个呼吸链的各种组分均存在于线粒体内膜中，而颗粒是氧化磷酸化的偶联因子，位于内膜的基质侧，它是基粒(ATP 酶复合物)的组分之一。

1. 电子传递链(呼吸链)

在线粒体内膜上存在有关氧化磷酸化的脂蛋白复合物，它们是传递电子的

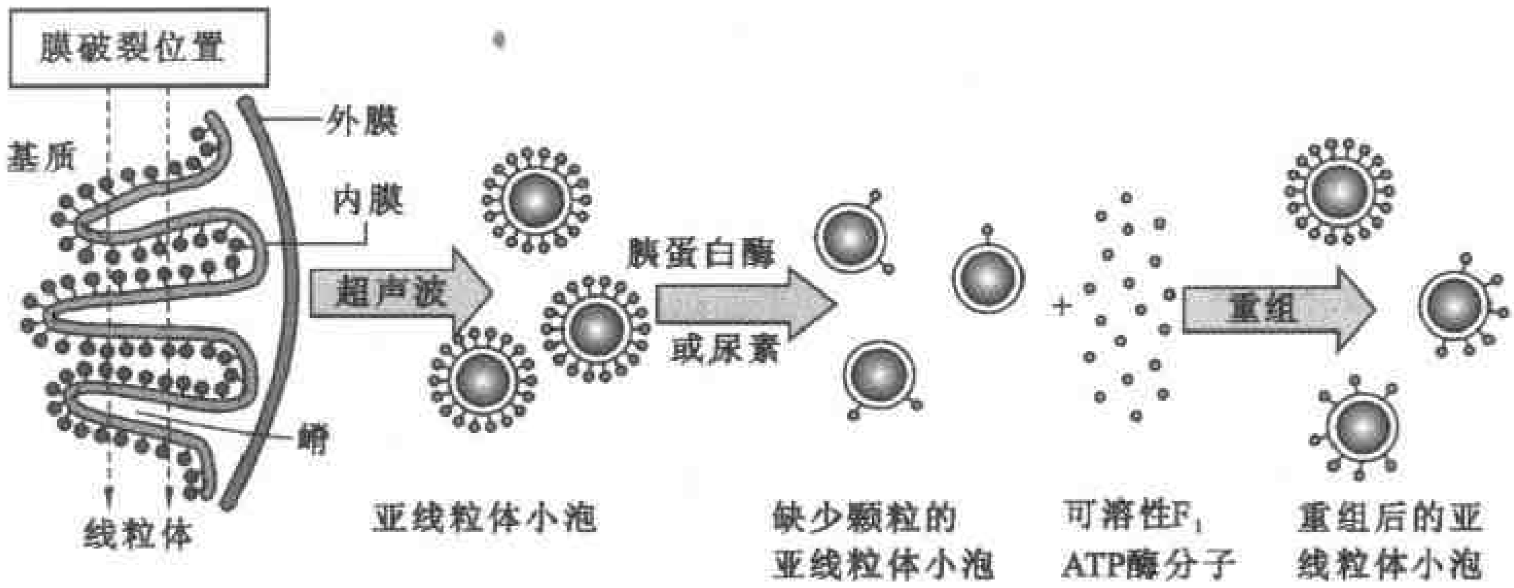


图 7－3 亚线粒体小泡的分离与重组

酶体系，由一系列能可逆地接受和释放电子或 H^+ 的化学物质所组成，在内膜上相互关联地有序排列，称为电子传递链（electron－transport chain）或呼吸链（respiratory chain）。目前普遍认为细胞内有两条典型的呼吸链，即 NADH 呼吸链和 $FADH_2$ 呼吸链。这是根据接受代谢物上脱下的氢的原初受体不同而区分的。

线粒体内膜上的呼吸链是典型的多酶氧化还原体系，由多个组分组成。参加呼吸链的氧化还原酶有：① 烟酰胺脱氢酶类（以 NAD^+ 或 $NADP^+$ 为辅酶）；② 黄素脱氢酶类（以黄素单核苷酸 FMN 或黄素腺嘌呤二核苷酸 FAD 为辅基）；③ 铁硫蛋白类（或称铁硫中心，FeS），分子中含非血红素铁和对酸不稳定的硫，其作用是通过铁的化合价的互变进行电子传递；④ 辅酶 Q 类，是一种脂溶性的醌类化合物，它具有 3 种不同的氧化还原状态，即氧化态 Q、还原态 QH_2 和介于两者之间的半醌 QH；⑤ 细胞色素类，是一类以铁卟啉为辅基的色蛋白，其主要功能是通过铁的化合价的互变传递电子。目前发现的细胞色素有 a、a_3、b、c、c_1 等。在 aa_3 分子中，除含血红素铁外，尚含有 2 个铜原子，依靠其化合价的变化，把电子从 a_3 传递到氧。

Green 等人首先将呼吸链拆离成 4 种功能复合物（Ⅰ～Ⅳ）以及辅酶 Q 和细胞色素 c。4 种复合物包埋在线粒体内膜中，辅酶 Q 和细胞色素 c 是呼吸链中可流动的递氢体或递电子体。复合物的组分和定位列于表 7－2。

复合物Ⅰ：是 NADH－CoQ 还原酶，又称 NADH 脱氢酶，由 25 条以上多肽链组成，总相对分子质量为 850×10^3，以二聚体的形式存在。每个单体含有一个黄素单核苷酸（FMN）和至少 6 个铁硫蛋白。它是呼吸链中最大最复杂的酶复合物，其作用是催化 NADH 的 2 个电子传给辅酶 Q，同时发生质子的跨膜输送，故复合物Ⅰ既是电子传递体又是质子移位体。

复合物Ⅱ：是琥珀酸－CoQ 还原酶，又称琥珀酸脱氢酶，由 4 条多肽链组成，总相对分子质量为 140×10^3，含有一个共价结合的黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）、2 个铁硫蛋白和一个细胞色素 b。其作用是催化电子从琥珀酸通过 FAD 和铁硫蛋白传给辅酶 Q。复合物Ⅱ不能使质子跨膜移位。

表 7－2　线粒体呼吸链的组分和定位

酶复合物	相对分子质量	亚基数	辅基	与膜结合方式	催化部位的定位
Ⅰ NADH－CoQ 还原酶	850 000	>25	FMN	嵌入	NADH:M 侧
			FeS	嵌入	CoQ:中间
Ⅱ 琥珀酸－CoQ 还原酶	140 000	4	FAD FeS	嵌入	琥珀酸酶:M 侧
			Heme b	嵌入	CoQ:中间
Ⅲ CoQ－细胞色素 c 还原酶	250 000	10	Heme b 562	嵌入	CoQ:中间
			Heme b 566	嵌入	细胞色素 c_1:C 侧
			Heme c_1 FeS	嵌入	
细胞色素 c	13 000	1	Heme c	外周	细胞色素 c:C 侧
Ⅳ 细胞色素氧化酶	160 000	6～13	Heme a	嵌入	细胞色素 a:C 侧
			Heme a_3	嵌入	O_2:M 侧
			Cu_A Cu_B	嵌入	

注:M 侧为线粒体基质侧,C 侧为膜间隙侧或称细胞质侧;Heme 为血红素

复合物Ⅲ:是 CoQ－细胞色素 c 还原酶,由 10 条多肽链组成,总相对分子质量为 250×10^3,以二聚体的形式存在。每个单体含有 2 个细胞色素 b(b562,b566)、一个细胞色素 c_1 和一个铁硫蛋白。其作用是催化电子从辅酶 Q 传给细胞色素 c,同时发生质子的跨膜输送,故复合物Ⅲ既是电子传递体,又是质子移位体。

复合物Ⅳ:是细胞色素氧化酶,由 6～13 条多肽链组成,总相对分子质量约为 160×10^3,以二聚体的形式存在。每个单体含有细胞色素 a 和 a_3 及 2 个铜原子(Cu_A,Cu_B)。其作用是催化电子从细胞色素 c 传给氧。同时发生质子的跨膜输送,故复合物Ⅳ既是电子传递体又是质子移位体。

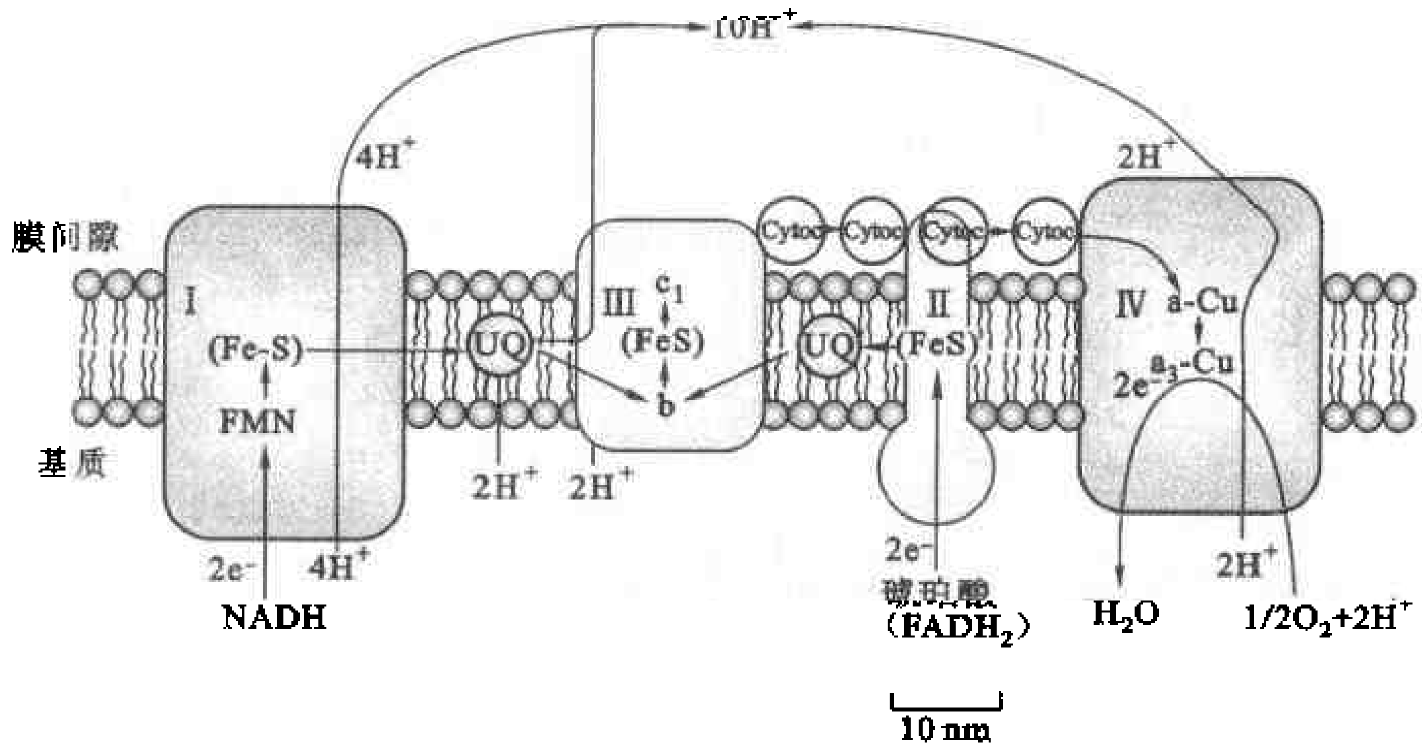
呼吸链的各组分在内膜上的含量比不同,不同种类细胞中线粒体的这种比例也不相同。大致比例为:复合物Ⅰ:Ⅲ:Ⅳ＝1:3:7。四种复合物在电子传递过程中协同作用。复合物Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ组成主要的 NADH 呼吸链,催化 NADH 的氧化;复合物Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组成 $FADH_2$ 呼吸链,催化琥珀酸的氧化(图 7－4)。

实验证明,呼吸链各组分有严格的排列顺序和方向。从 NADH 到分子氧之间的电子传递过程中,电子是按氧化还原电位从低向高传递。NAD^+/NADH 的氧化还原电位值最低 ($E'_0=-0.32V$),O_2/H_2O 的氧化还原电位值最高($E'_0=+0.82V$)。根据实验测定的呼吸链各组分的氧化还原电位值确定其排列顺序,因为各组分在链上的顺序与其得失电子的趋势有关,电子总是从低氧化还原电位向高氧化还原电位流动。氧化还原电位值愈低的组分供电子的倾向愈大,愈易成为还原剂而处于传递链的前面。通过利用呼吸抑制剂(鱼藤酮、抗霉菌素 A、CN^- 或 CO 等)阻断电子传递的实验也可以帮助确定传递链各组分的排列顺序。现在一般公认的各组分的排列顺序也即电子流的路径为:

电子传递方向　NADH $\xrightarrow{\text{鱼藤酮}}$ FMN → CoQ $\xrightarrow{\text{抗霉菌素 A}}$ b → c_1 → c → aa_3 $\xrightarrow{CN^-\text{或 CO}}$ O_2

E'_0　低→高　－0.32　－0.3　0.1　0.07　0.22　0.25　0.29　0.82

2. ATP 合成酶的分子结构与组成



亚基	复合物 I NADH脱氢酶（哺乳动物类）	复合物III 细胞色素bc_1	复合物II 琥珀酸脱氢酶	复合物IV 细胞色素c氧化酶
mtDNA	7	1	0	3
nDNA	35	10	4	10
总计	42	11	4	13

图 7－4 线粒体内膜呼吸链电子传递示意图（引自 Gerald Karp, 1999）

ATP 合成酶（ATP synthetase）或 F_1F_0－ATP 酶（或 H^+－ATP 酶）广泛存在于线粒体、叶绿体、异养菌和光合细菌中，是生物体能量转换的核心酶。该酶分别位于线粒体内膜、类囊体膜或质膜上，参与氧化磷酸化和光合磷酸化，在跨膜质子动力势的推动下催化合成 ATP。如果将 ATP 比喻为细胞内的能量货币，ATP 合成酶则应比喻为制作货币的“印钞机”，因为 ATP 合成最终是在 ATP 合成酶催化下完成的。由此看出，ATP 合成酶是线粒体氧化磷酸化和叶绿体光合磷酸化偶联的关键装置，也是合成能源物质 ATP 的关键装置。不同来源的 ATP 合成酶基本上有相同的亚基组成和结构，都是由多亚基装配形成的。其分子结构由突出于膜外的 F_1 头部和嵌于膜内的 F_0 基部两部分组成（图 7－5）。

F_1（偶联因子 F_1）：为水溶性球蛋白，从内膜突出于基质内，较易从膜上脱落。牛心线粒体 ATP 酶的 F_1 部分（F_1－ATPase）相对分子质量为 371×10^3，由 3α、3β、1γ、1δ 和 1ε 等 9 个亚基组成，其中每一个 α、β、γ、δ、ε 亚基的氨基酸残基数分别为 510、482、272、126 和 50。根据 0.28 nm 分辨率的 X 射线晶体衍射分析证实，3 个 α 亚基和 3 个 β 亚基交替排列，形成一个“橘瓣”状结构，各亚基分离时无酶活性，结合时有酶活性。α 和 β 亚基上均具有核苷酸结合位点，其中 β 亚基的结合位点具有催化 ATP 合成或水解的活性。动物线粒体 F_1 还有抑制蛋白（inhibitor protein），专一地抑制 F_1－ATP 酶的活力，在正常条件下可能起生理调节作用，即有调节酶活性的功能，但不抑制 ATP 合成。γ 与 ε 亚基有很强的亲和力，结合在一起形成“转子”（rotor），位于 $\alpha_3\beta_3$ 的中央，共同旋转以调节三个 β 亚基催化位点的开放和关闭。ε 亚基有抑制酶水解 ATP 的活性，同时还

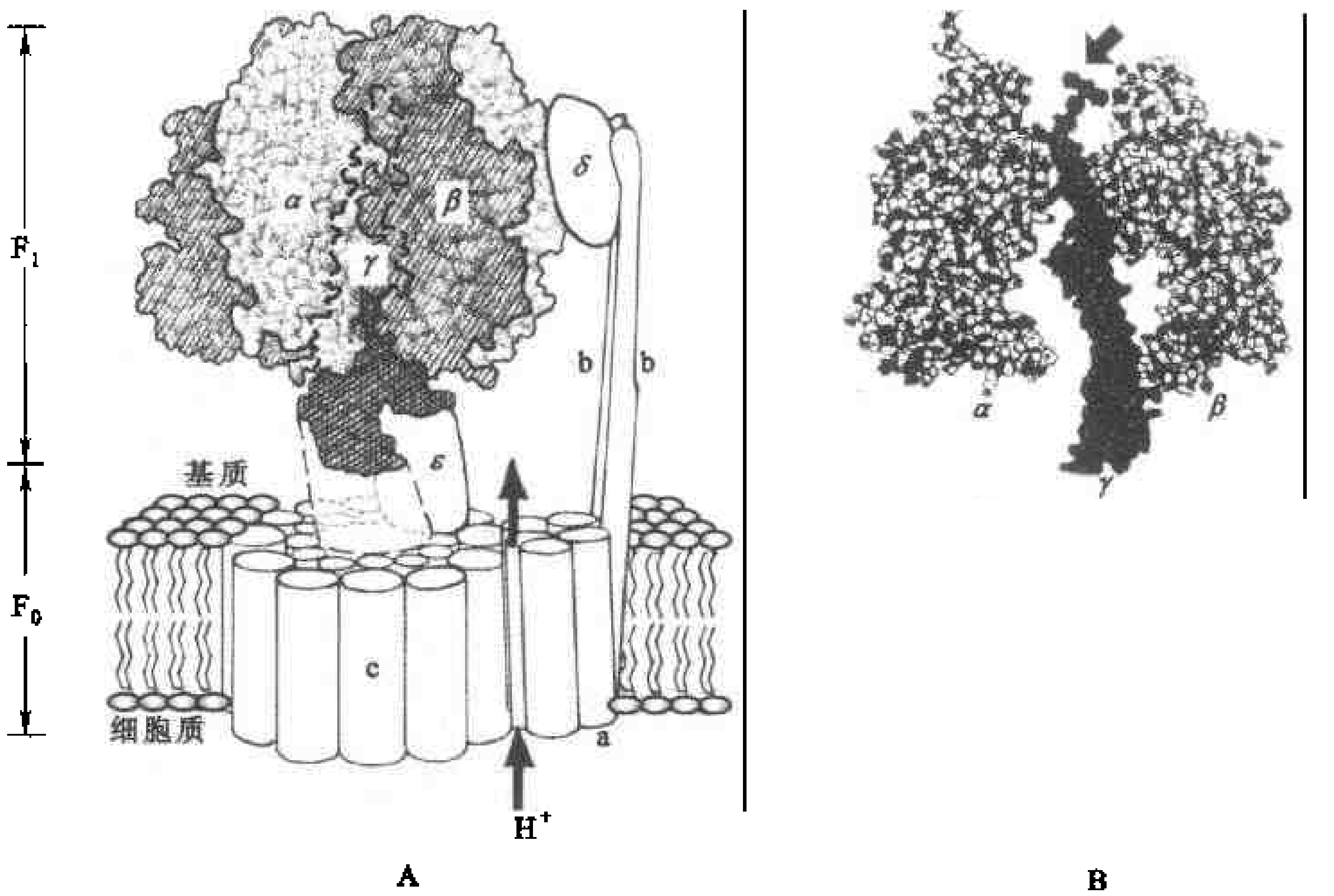


图 7-5　线粒体的 ATP 合成酶的基本结构

A: F_1(阴影部分)为牛心线粒体 ATP 合成酶晶体结构,F_0(其余部分)为细菌 ATP 合成酶的晶体结构示意图(转引自 Matti Saraste,1999)

B: F_1 为线粒体 ATP 合成酶三维结构的一部分,箭头指处是用来观察 γ 亚基旋转的荧光标记物(转引自 Gerald Karp, 1999)

有堵塞 H^+ 通道、减少 H^+ 泄漏的功能。

F_0(偶联因子 F_0):是嵌合在内膜上的疏水蛋白复合体,形成一个跨膜质子通道。F_0 的亚基类型和组成在不同物种中差别很大,在细菌中,F_0 由 a、b、c 3 种亚基组成;蓝藻中为 a、b、b′、c 亚基;在叶绿体内与之相对应的是Ⅳ、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 4 种亚基;线粒体内的 F_0 更为复杂。F_0 各亚基的数量关系只有细菌的被确定为 $a_1b_2c_{10-12}$。电镜观察显示,多拷贝的 c 亚基形成一个环状结构,a 亚基与 b 亚基二聚体排列在 c 亚基 12 聚体形成的环的外侧,a 亚基、b 亚基二聚体和 δ 亚基共同组成"定子"(stator)(图 7-5)。F_0 中的一个亚基可结合寡霉素,通过该亚基可调节通过 F_0 的 H^+ 流,如当质子动力势很小时,它可防止 ATP 水解;又可起到保护自身和抵抗外界环境变化的作用。

F_1 和 F_0 通过"转子"和"定子"将两部分连接起来,在合成或水解 ATP 的过程中,"转子"在通过 F_0 的 H^+ 流推动下旋转,依次与 3 个 β 亚基作用,调节 β 亚基催化位点的构象变化;"定子"在一侧将 $\alpha_3\beta_3$ 与 F_0 连接起来。F_0 的作用之一,就是将跨膜质子动力势转换成扭力矩(torsion),推动"转子"旋转。

呼吸链的各组分和 ATP 合成酶在线粒体内膜上的分布是不对称的,数量也不相等。例如,心肌线粒体中,ATP 合成酶:复合物Ⅲ:细胞色素 c:复合物Ⅳ = 1:1:2:2。呼吸链的各组分和 ATP 合成酶约占内膜蛋白质的 32%~40%,其中

ATP 合成酶约占 15%。

3．氧化磷酸化作用与电子传递的偶联

氧化还原的本质是电子的转移。氢原子的转移其本质也是电子转移，因为 H 原子可分解为 H^+ 与 e^-。当电子从 NADH 或 $FADH_2$ 经呼吸链传递给氧形成水时，同时伴有 ADP 磷酸化形成 ATP，这一过程称为氧化磷酸化。氧化磷酸化是生成 ATP 的一种主要方式，是细胞内能量转换的主要环节。实验证明，呼吸链中有 3 个部位的自由能变化较大，这 3 个部位是呼吸链中氧化还原释放的能量与 ADP 磷酸化生成 ATP 的偶联部位，也即是呼吸链上可被特异性抑制剂阻断的部位。NADH 呼吸链生成 ATP 的 3 个部位是：① NADH 至辅酶 Q；② 细胞色素 b 至细胞色素 c；③ 细胞色素 aa_3 至氧之间（图 7－6）。3 处各生成一分子 ATP，共生成 3 个 ATP 分子。但 $FADH_2$ 呼吸链只生成 2 个 ATP 分子，这是因为电子从 $FADH_2$ 至辅酶 Q 间传递所释放的能量不足以形成高能磷酸键所致。

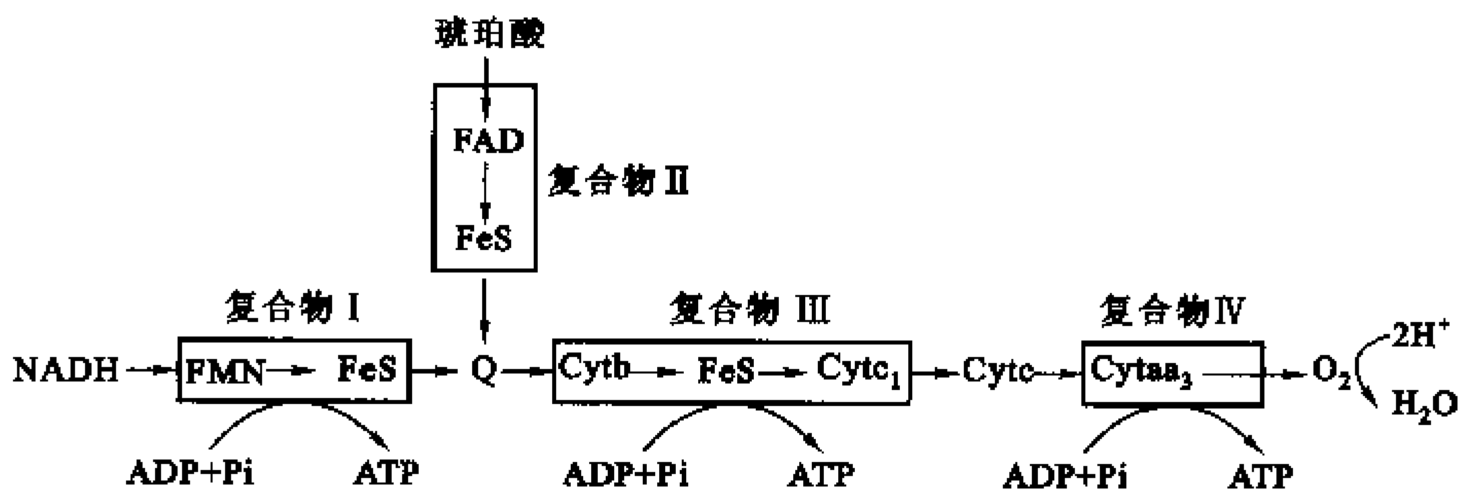


图 7－6 线粒体内膜中的呼吸链的组分、排列和氧化磷酸化的偶联部位

（二）氧化磷酸化的偶联机制

氧化磷酸化的偶联机制一直是研究氧化磷酸化作用的关键，也是大家最关注的中心问题。20 多年来提出了各种假说，主要有：化学偶联假说（chemical coupling hypothesis）、构象偶联假说（conformational coupling hypothesis）、化学渗透假说（chemiosmotic coupling hypothesis）等。现在越来越多的实验证明：偶联机制在生化上来说是向量的，在功能上来说是渗透性的。所以化学渗透假说已成为氧化磷酸化机制研究中最为流行的一种假说。该假说是 1961 年英国生物化学家 Mitchell 提出来的，他因此获得了 1978 年诺贝尔化学奖。

化学渗透假说的主要内容是：呼吸链的各组分在线粒体内膜中的分布是不对称的，当高能电子在膜中沿呼吸链传递时，所释放的能量将 H^+ 从内膜基质侧泵至膜间隙，由于膜对 H^+ 是不通透的，从而使膜间隙的 H^+ 浓度高于基质，因而在内膜的两侧形成电化学质子梯度（electrochemical proton gradient，$\Delta\mu H^+$），也称为质子动力势（proton motive force，ΔP）。在这个梯度驱动下，H^+ 穿过内膜上的 ATP 合成酶流回到基质，其能量促使 ADP 和 Pi 合成 ATP。质子动力势（ΔP）由两部分组成：一是膜内外 H^+ 浓度差（ΔpH），二是膜电位（$\Delta\psi$）。ΔP 与

ΔpH 和 $\Delta\psi$ 的关系如下：

$$\Delta P = \Delta\psi - 2.3\,\frac{RT}{F}\Delta pH$$

式中 R 为气体常数，T 为绝对温度，F 为法拉第(Faraday)常数。质子动力势 ΔP 的单位为 mV，电化学质子梯度 $\Delta\mu H^+$ 的单位为 J/mol。

综上所述，可以把线粒体内膜中的呼吸链看做是质子泵，在电子经呼吸链传递给氧的过程中，可把基质中的 H^+ 泵至膜间隙。其反应过程是：呼吸链从 NADH 开始，它提供 2 个电子和 1 对 H^+ 传递给 NADH 脱氢酶上的黄素单核苷酸(FMN)，而 FMN 被还原成 $FMNH_2$，$FMNH_2$ 把 1 对 H^+ 释放到膜间隙，同时将 1 对电子经铁硫蛋白(FeS)传给靠近内膜内侧的 2 个辅酶 Q。每个辅酶 Q 先自复合物Ⅲ中的细胞色素 b 获得 1 个电子，并从基质中摄取 1 个 H^+，而被还原为半醌(QH)，QH 再接受从复合物Ⅰ传递来的 1 个电子，同时又从基质中摄取 1 个 H^+，形成氢醌(QH_2)。QH_2 通过构象改变移动到内膜外侧时，先后向膜间隙释放 2 个 H^+，同时，QH_2 的 2 个电子中的 1 个先交还给细胞色素 b；另外 1 个电子经 FeS 传给细胞色素 c_1，细胞色素 c_1 又将电子传递给内膜外缘的细胞色素 c，辅酶 Q 则从内膜外侧回到内侧，完成 Q 循环(Q Cycle)。因此，通过 Q 循环，每传递 1 个电子，就有 2 个 H^+ 被泵到膜间隙。细胞色素 c 在膜间隙扩散，将电子传递给复合物Ⅳ，基质侧的 H^+ 可通过复合物Ⅳ的质子通道又回到膜间隙，复合物Ⅳ的 aa_3 将电子传给 $1/2O_2$ 使生成 O^{2-} 而与基质中的 2 个 H^+ 结合生成水。由此可见，电子在传递过程中，不断有 H^+ 从线粒体基质中抽提至膜间隙(图 7－7)。

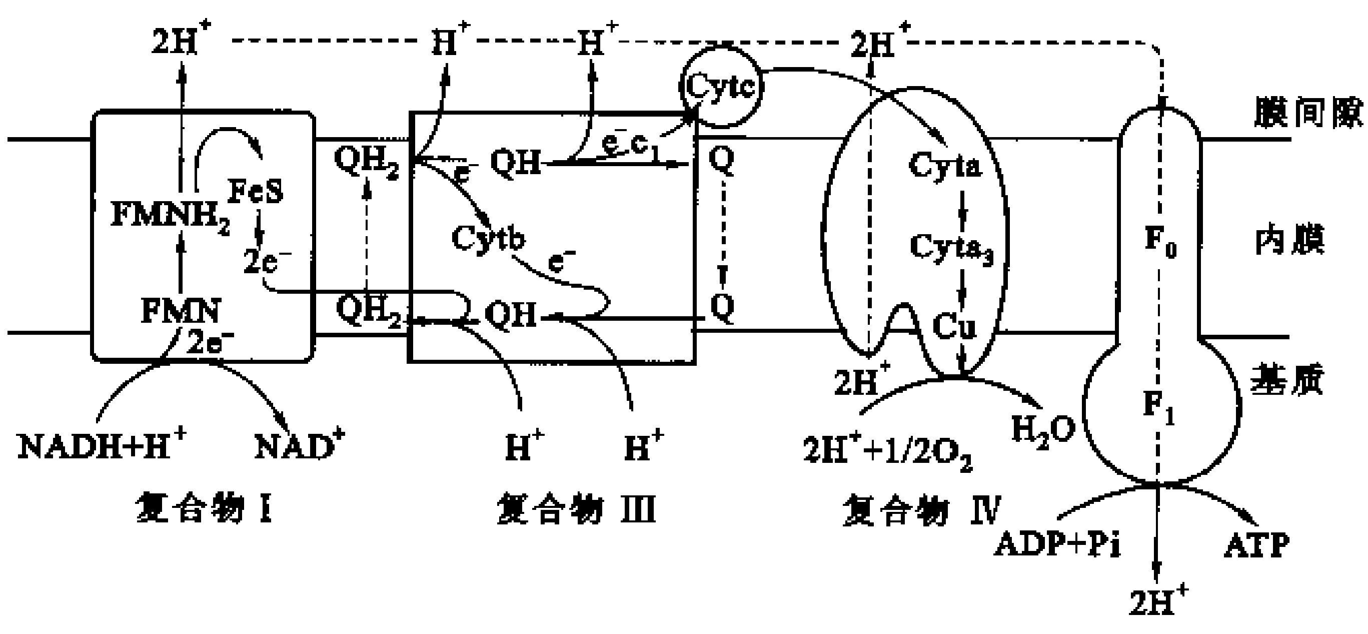


图 7－7　线粒体内膜中通过呼吸链进行氧化磷酸化的图解

由于线粒体内膜对 H^+ 又不能自由通过，造成了 H^+ 浓度的跨膜梯度，并使原有的外正内负的跨膜电位差增高，H^+ 浓度梯度和跨膜电位就共同构成了质子动力势，质子动力势推动 H^+ 通过 ATP 合成酶装置进入基质，每进入 2 个 H^+ 可

驱动合成 1 个 ATP 分子。根据化学渗透假说，电子及质子通过呼吸链上电子载体和氢载体的交替传递，在线粒体内膜上形成 3 次回路，导致 3 对 H^+ 由基质抽提至膜间隙，生成 3 个 ATP 分子。

化学渗透假说有两个特点：一是强调线粒体膜结构的完整性。如果膜不完整，H^+ 便能自由通过膜，则无法在内膜两侧形成质子动力势，那么氧化磷酸化就会解偶联。一些解偶联剂的作用就在于改变膜对 H^+ 的通透性，从而使电子传递所释放的能量不能转换合成 ATP；二是定向的化学反应。ATP 水解时，H^+ 从线粒体内膜基质侧抽提到膜间隙，产生电化学质子梯度。ATP 合成的反应也是定向的，在电化学质子梯度推动下，H^+ 由膜间隙通过内膜上的 ATP 合成酶进入基质，其能量促使 ADP 和 Pi 合成 ATP。虽然化学渗透假说得到了许多实验结果的支持。但目前也有不少科学家对化学渗透假说持有不同看法，随着研究工作的深入，得出了与其相矛盾的实验结果。如芬兰科学家 Wikstrom(1980 年)的实验表明，细胞色素氧化酶也有质子泵的作用。另外，有的科学家发现，一种细菌(*Bacillus megaterium*)变种，其细胞膜的质子梯度被解偶联剂解除后，仍能进行 ATP 合成。反之，有一些抑制剂能显著抑制氧化磷酸化作用，而 $\Delta\mu H^+$ 却很少受影响。如果将 ATP 合成酶的 F_1 不可逆地失活，ATP 驱动的琥珀酸还原 NAD 的反应即受到抑制，但对 $\Delta\mu H^+$ 却无任何影响。由此可见，这些结果难以用化学渗透假说来解释。因此，不断有人提出一些修正或新的假说来解释能量的转换机理，如 Williams 假说和 Boyer 的 ATP 合成酶的结合变化机制(binding change mechanism) 以及 Slater 提出的碰撞假说(collision hypothesis)等。近年来，随着结构生物学的深入研究，对 ATP 合成机制已有了进一步的认识。

(三) ATP 合成酶的作用机制

ATP 合成酶的各种亚基是如何协同作用利用跨膜的质子梯度形成 ATP，在 ATP 形成过程中 ATP 合成酶又是如何起作用等问题，一直是最具吸引力的研究课题之一，随着 ATP 合成酶三维结构研究的突破，现在这个奥秘已逐渐揭开。最近许多实验结果表明，ATP 合成酶可能是已发现的自然界最小的分子“马达”，其运转效率几乎达 100%。

美国生物化学家 Boyer 提出的 ATP 合成酶的结合变化和旋转催化机制最近得到最新实验证据的支持。ATP 合成酶与核苷酸的结合是按照结合变化机制(binding change mechanis)进行的，即在任一时刻，F_1 上 3 个 β 催化亚基的构象总是不同的，与核苷酸结合也不一样，每个催化位点与核苷酸的结合按顺序经过三种构象状态：紧密结合态(T 态)、松散结合态(L 态)和空置状态(不与任何核苷酸结合的 O 态)。在 ATP 合成过程中，3 个 β 催化亚基的构象发生顺序变化，每一个催化亚基要经过 3 次构象改变才催化合成 1 个 ATP 分子。这样较好地表示了 β 亚基构象交替变化与底物结合和 H^+ 转运之间的关系(图 7－8)。图中所示，ADP 和 Pi 与 β_2 结合，在较少能量变化情况下，ADP 与 Pi 形成 ATP；在质子流推动下，$\alpha_3\beta_3$ 亚基相对于“转子”旋转 120°，3 个 β 亚基随即发生构象改变，使 β 亚基对 ATP、ADP 和 Pi 的亲和力产生变化，从而引起 ATP 从 β_2 上释

放出来，空出的结合位点又可与新的 ADP 和 Pi 结合。由此看出，结合变化机制主要涉及的是 3 个 β 催化亚基在合成或水解 ATP 过程中的构象变化，其构象变化由转子的转动来实现。转子相对于 $\alpha_3\beta_3$ 亚基旋转周期时间为 100 ms，这与 F_1 水解 ATP 的速率是相同的。ATP 合成酶是如何催化合成 ATP 的，目前认为是按照"旋转催化(rotational catalysis)"的模式进行的。在大肠杆菌 ATP 合成酶中，发现 H^+ 通过 F_0 的转运需要 a、b、c 3 种亚基参与，a 亚基至少含有 5 个跨膜 α 螺旋，其第四个 α 螺旋上的 Arg210 被认为是 H^+ 转运所必需的；b 亚基是单跨膜亚基，有一个很长的亲水头部；c 亚基有两个跨膜 α 螺旋和一个突出于胞质侧的发夹结构，其第 2 个 α 螺旋上的 Asp61 被认为是 H^+ 结合位点，其质子化/去质子化循环可以转运 H^+。ATP 的合成和 H^+ 的转运偶联的具体过程有可能是按下述方式进行：① F_0 的 a 亚基 Arg210 和 c 亚基 Asp61 产生瞬间的盐桥，使 c 亚基 Asp61 从高 pKa 态变成较低 pKa 态。此时，H^+ 在跨膜质子动力势推动下进入 F_0，与 c 亚基结合，导致 c 亚基构象发生变化，c 亚基极性环旋转，同时与 $\gamma\varepsilon$ 亚基结合；② a 亚基与 c 亚基解聚，c 亚基 Asp61 重新回到高 pKa 态，Asp61 的羧基移向基质侧，H^+ 从 61 位的 Asp 中释放出来，同时 c 亚基极性环与 $\gamma\varepsilon$ 亚基解离。$\gamma\varepsilon$ 与 F_0 的 a 或 b 亚基的非对称性结合，使 $\gamma\varepsilon$ 按一定方向(顺时针或逆时针)与下一个低 pKa 态的 c 亚基极性环结合；F_0 上 H^+ 的转运积累到足够的扭力矩时，推动 $\gamma\varepsilon$ 相对于 $\alpha_3\beta_3$ 旋转 120°，而 $\gamma\varepsilon$ 通过与 β 亚基核苷酸结合位点的作用使 β(ATP)亚基释放一个 ATP 分子。但旋转催化假说的真正阐明并被接受还是在获得 ATP 酶的晶体结构并设计了一些非常具有说服力的实验之后。

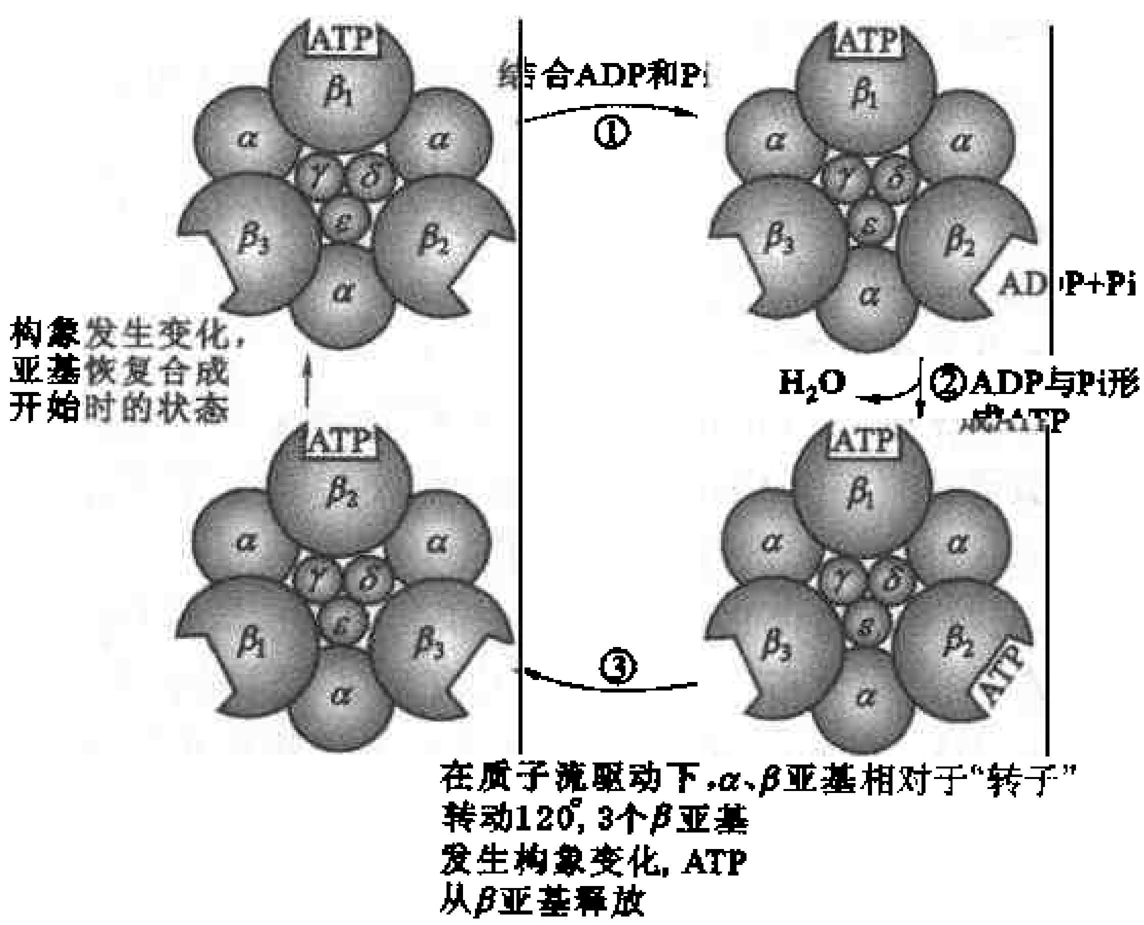


图 7－8　ATP 合成酶催化 ADP 和 Pi 合成 ATP 的转动模型

1994 年 Walker 等发表了 0.28 nm 分辨率的牛心线粒体 F_1 - ATP 酶的晶体结构。这是目前在原子分辨率解出的最大的具有不对称结构的蛋白质，为 Boyer 提出的结合变化和旋转催化机制提供了结构基础，他也因此与 Boyer 分享了 1997 年的诺贝尔化学奖。根据 Walker 等的报道，可以清楚地看到 F_1 - ATP 酶像橘子一样呈扁圆球体，高 8 nm，宽 10 nm，α 和 β 亚基像橘子瓣一样地绕 γ 亚基的 C 端（γ209～272）形成的 9 nm 长的中心 α 螺旋交替排布。α 螺旋 C 端残基在顶部的表面插入约 1.5 nm 的凹槽，此螺旋的底部与 γ1～45 形成的第二个螺旋为左手反平行的螺旋结构，此螺旋结构相对颈的底部突出大约 3 nm，是 ATP 酶的 4.5 nm 主颈的一部分。从晶体结构可观察到 ATP 酶的 3 个催化亚基由于结合的核苷酸底物不同，而呈现不同的构象，有力地支持了 Boyer 提出的结合变化机制，证明在催化循环的任一时刻，3 个催化亚基处于不同的构象状态，不同构象的转化与位于 $\alpha_3\beta_3$ 中央的 γ 亚基的转动运动相关。Noji 等利用线粒体 F_1 - ATP 酶的晶体结构研究的结果，精心设计了一系列的标记、突变，并采用最新的荧光显微镜摄像技术，将 γ 亚基的转动运动展显出来。这个结果清楚地表明，γ 亚基是在 $\alpha_3\beta_3$ 形成的圆筒中转动的，转动是单方向反时针进行的。转动使中心的 γ 亚基能够与三个 β 亚基按顺序由空位、ADP 结合位到 AMP - PNP 结合位发生接触，这个顺序正好与预言的 ATP 水解反应从 ATP→ADP→空位点的转动顺序一致。这个实验使我们清楚地看到 F_1 - ATP 酶确实是一个分子"马达"，证明了旋转催化假说的正确性。

经过 20 多年的实验研究，终于证实了 Boyer 早期提出的设想：当 H^+ 流跨膜转运时，带动 ATP 合成酶基部的类车轮结构和与之连接的轴进行转动，就像水流带动水轮机一样。这一转动继而引起与轴相连的三个叶片（即 3 个 β 亚基）发生一定的构象变化，结果使 ADP 和 Pi 合成 ATP 分子并将其释放出来。形象地刻画出 ATP 合成酶的催化循环犹如一部精密的分子"水轮机"。

四、线粒体与疾病

线粒体是细胞内最易受损伤的一个敏感的细胞器，它可显示细胞受损伤的程度。许多研究工作表明，线粒体与人的疾病、衰老和细胞凋亡有关，线粒体的异常会影响整个细胞的正常功能，从而导致病变。有人将这一类疾病称为"线粒体病"（mitochondrial diseases，MD）。当然，很多疾病的病变也可引起细胞内线粒体产生继发性的变化，如肝癌细胞线粒体内的己糖激酶活性明显高于正常细胞。线粒体病是指那些在病变细胞内较早出现的线粒体极为明显异常的病理变化。

克山病就是一种心肌线粒体病（mitochondrial cardiomyopathy）。它是以心肌损伤为主要病变的地方性心肌病，因营养缺乏（缺硒）而引起。患者线粒体硒含量明显降低，慢性者为正常量的 1/2，亚急性者为正常量的 12.5%。硒对线粒体膜有稳定作用，患者因缺硒而导致心肌线粒体出现膨胀、嵴稀少和不完整；琥

琥酸脱氢酶、细胞色素氧化酶和ATP合成酶活性及其对寡霉素的敏感性都有明显降低;膜电位下降,膜流动性减低;对电子传递和氧化磷酸化偶联均有明显影响。

随着研究工作的不断深入,发现人的细胞中线粒体的数量随年龄增长而减少,而体积却随年龄增长而增大。在膨大的线粒体中有时可见其内容物网状化而呈多囊体。同时线粒体病的研究已与线粒体DNA(mtDNA)的损伤、缺失相联系,随着年龄的增长,损伤mtDNA的积累愈来愈多。有实验证明,在心或脑中缺失7.4 kb或5.0 kb片段的mtDNA的含量随年龄增长有明显增加。人脑部区域mtDNA损伤程度63～77岁比24岁的增长14倍,80岁又比63～77岁的增大4倍。目前已知的100多种人类线粒体疾病,其原发机制都是mtDNA异常(突变、缺失、重排)引起的遗传性疾病,表现为呼吸链的电子传递酶系和氧化磷酸化酶系的异常。有些学者认为,线粒体是细胞内自由基的源泉,它们是决定细胞衰老的生物钟,机体95%以上的氧自由基都来自线粒体的呼吸链,电子传递过程中的单电子漏给分子氧是氧自由基(和过氧化氢)等活性氧生成的主要原因,复合物Ⅰ和Ⅲ是其产生的主要部位,Q循环反应中的QH或还原性细胞色素b566是单电子漏出的主要电子供体。正常情况下,氧自由基可被线粒体中的Mn^{2+}-SOD所清除,机体衰老及退行性疾病时Mn^{2+}-SOD活性降低,氧自由基就积累在线粒体中。据估计,因生物氧化而产生的氧自由基,其氧化损伤的mtDNA的积累量可比核DNA高16倍,而且因损伤后的mtDNA的复制又较完好的mtDNA要快得多,这样,经过一定时间的累积就会导致线粒体内膜参与能量转换的酶系功能异常。近年来,Gummings等人发现真菌细胞的线粒体中存在衰老DNA,很可能它会抑制mtDNA的复制,从而导致线粒体结构与功能的破坏,引起细胞衰老和死亡。此外,线粒体还与细胞凋亡有关。1995年Wang等人发现各种凋亡诱导因子诱发细胞凋亡后,胞质中细胞色素c含量增加。进一步研究还发现,只有成熟的细胞色素c(holocytochrome c)才有引起细胞凋亡的作用,而在胞质中内质网核糖体合成的细胞色素c前体(apocytochrom c)则无此作用,亦即只有线粒体释放的细胞色素c才有凋亡作用。这表明线粒体是通过释放细胞色素c参与细胞凋亡的。

第二节　叶绿体与光合作用

植物细胞与动物细胞的一个重要差别,是它具有自己独特的质体细胞器。在植物细胞中,质体是以不同的形态和功能存在的,通常分为叶绿体(chloroplast)、有色体(chromoplast)和白色体(leucoplast)3大类。其中叶绿体是质体中研究得最详细、功能最重要的一种细胞器,是植物细胞所特有的能量转换细胞器,其主要功能是进行光合作用。

一、叶绿体的形状、大小和数目

叶绿体的形状、大小和数目因植物种类不同而有很大差别，特别是藻类的叶绿体变化更大，而且叶绿体并不是一种稳定的细胞器，它能够伴随着不同的环境条件，如光照条件，产生不同的适应性变化。事实上，许多叶绿体基因是属于光诱导的基因。高等植物的叶绿体大多数呈香蕉形，一般直径为 3～6μm，厚约 2～3μm。叶肉细胞内一般含有 50～200 个叶绿体，可占细胞质体积的 40%～90%。据统计，蓖麻叶 1 mm^2 就含有 3×10^7～5×10^7 个叶绿体，叶绿体的总表面积比叶面积大得多，这无疑有利于植物对太阳光辐射能和空气中 CO_2 的吸收和利用。

二、叶绿体的结构和化学组成

在电子显微镜下可以看到，叶绿体是由叶绿体膜（chloroplast membrane）或称叶绿体被膜（chloroplast envelope）、类囊体（thylakoid）和基质 3 部分构成（图 7－9）。

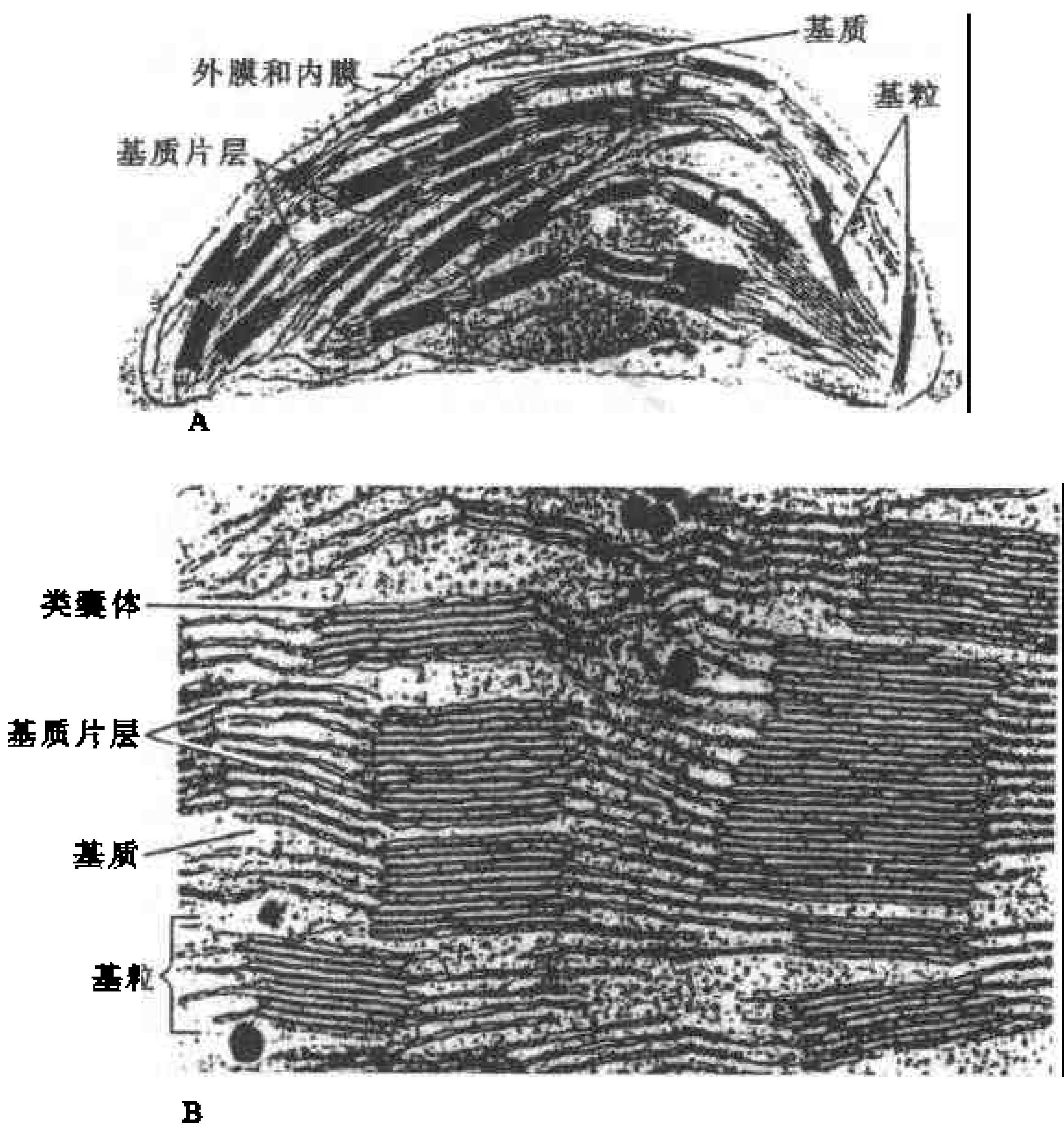


图 7－9　叶绿体的电子显微图（引自 W.P.Wergin）
A：12 800 倍　B：44 400 倍

(一) 叶绿体膜

叶绿体表面由双层单位膜即外膜和内膜所组成。每层膜厚约 6～8 nm，内外膜之间为 10～20 nm 宽的电子密度低的空隙，称为膜间隙（intermembrane space）。叶绿体膜具有控制代谢物进出叶绿体的功能，但外膜通透性大，许多化合物如核苷、无机磷、磷酸衍生物、羧酸类化合物等均可透过；内膜对物质透过的选择性强，是细胞质和叶绿体基质间的功能屏障。有些化合物如磷酸甘油酸、苹果酸、草酰乙酸等不能直接透过内膜，需由内膜上的特殊载体——转运体（translocator）的协助才能通过。

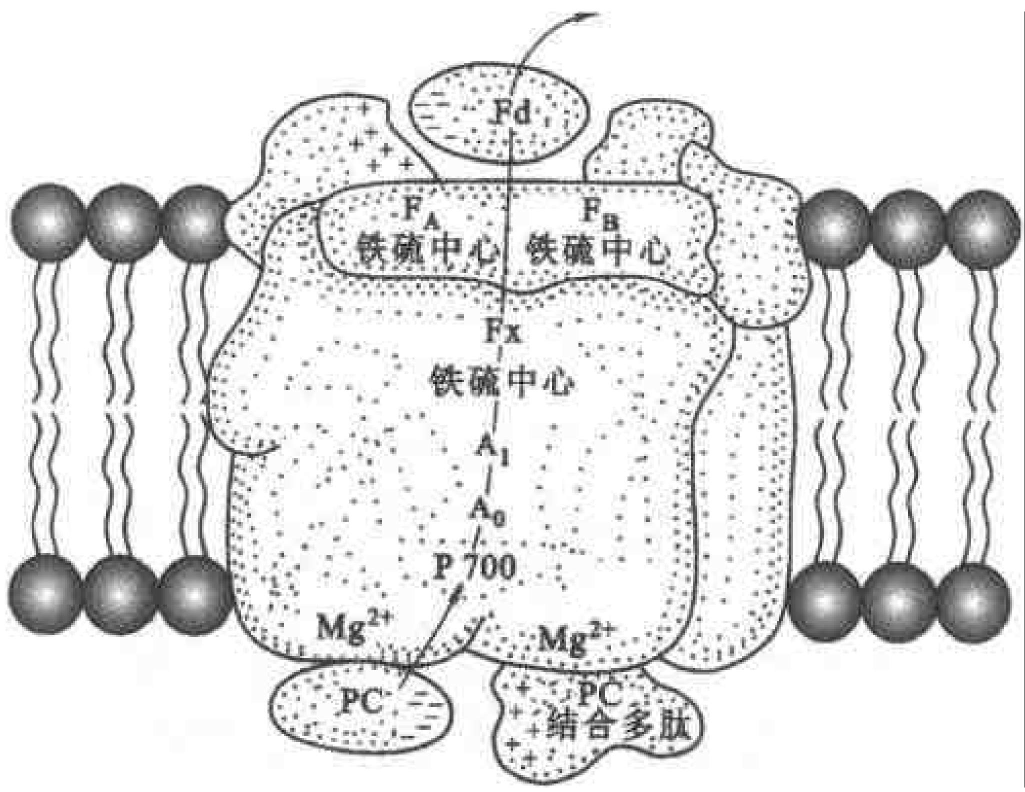
叶绿体膜的主要成分是蛋白质和脂质。蛋白质的含量占叶绿体的 0.3%～0.5%，其余的蛋白质分布在基质和类囊体中。脂质中以磷脂和糖脂最多。在叶绿体膜中已知的酶类有：ATP 酶、腺苷酸激酶、半乳糖基转移酶以及参与糖脂合成和代谢有关的一些酶等。

(二) 类囊体

1. 类囊体的结构

在叶绿体基质中，有许多由单位膜封闭形成的扁平小囊，称为类囊体。类囊体一般沿叶绿体长轴平行排列。在某些部位，许多圆饼状的类囊体叠置成垛，称为基粒（grana）。组成基粒的类囊体称为基粒类囊体（granum thylakoid），其片层称为基粒片层（grana lamella）。贯穿在两个或两个以上基粒之间没有发生垛叠的类囊体，称为基质类囊体（stroma thylakoid），其片层称为基质片层（stroma lamella）。基粒类囊体的直径约为 0.25～0.8μm，厚约 0.01μm。一个叶绿体含有 40～60 个甚至更多的基粒，一个基粒约由 5～30 个基粒类囊体组成，最多的可达上百个。组成基粒类囊体的数目依不同植物或同一植物不同部位的细胞而有很大变化。例如，烟草叶绿体的基粒有 10～15 个类囊体，玉米则有 15～50 个。同是冬小麦，基粒类囊体数目随叶位上升而增多，至旗叶达到高峰。现已发现类囊体的垛叠是动态的，即垛叠与非垛叠是可逆发生的。类囊体垛叠成基粒，是高等植物细胞所特有的膜结构，这种结构大大增加了膜片层的总面积，更有效地捕获光能，加速光反应。由于相邻基粒经网管状或扁平状的基质类囊体相连，使类囊体腔彼此相通，因而一个叶绿体内的全部类囊体实际上是一个完整连续的封闭膜囊，这就使膜系统的膜囊与基质相隔开，有利于光合磷酸化过程中 H^+ 梯度的形成。冰冻蚀刻电镜术观察到，在类囊体膜中镶嵌有大小、数量不同的颗粒，集中了光合作用能量转换功能的全部组分。这些组分包括：捕光色素（天线色素）、两个光反应中心、各种电子载体、合成 ATP 的系统和从水中抽取电子的系统等。它们分别装配在光系统Ⅰ（photosystem Ⅰ，PSⅠ）、光系统Ⅱ（photosystem Ⅱ，PSⅡ）、细胞色素 bf、CF_0-CF_1ATP 酶等主要的膜蛋白复合物中。PSⅠ和 PSⅡ复合物都是由核心复合物（core complex）和捕光复合物（light harvesting complex，LHC）组成，但它们在组分、结构甚至功能上是不同的。PSⅡ的核心复合物是由 20 多个不同的多肽组成的叶绿素蛋白质复合体，它的反应中心多肽很可能是两个 $Mr\ 32\times10^3$ 的蛋白 D1 和 D2；PSⅠ的核心复合物的反应中心是一

个包含多种不同还原中心的多蛋白复合体(图 7－10)。



A

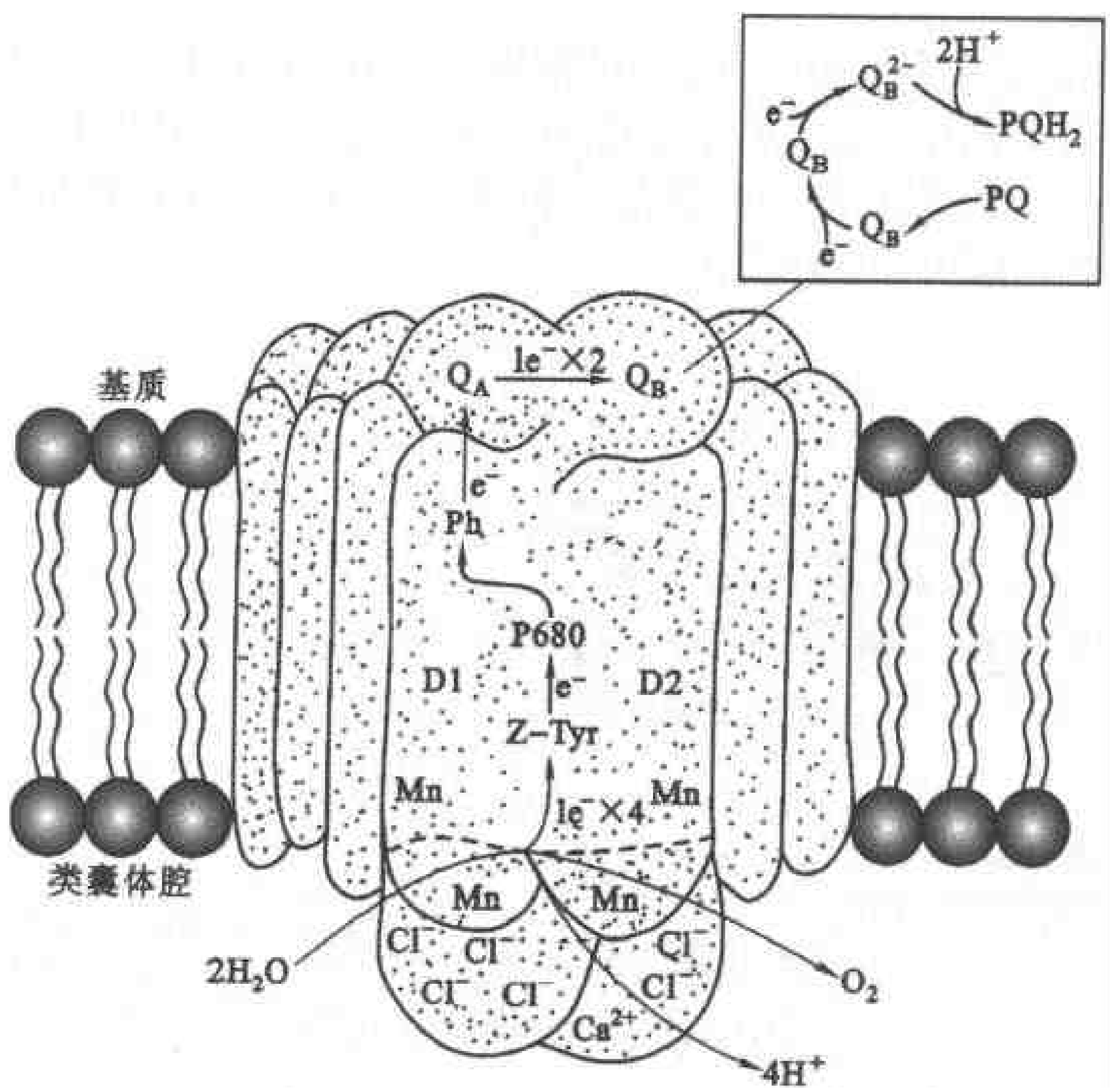


图 7－10 光系统Ⅰ和光系统Ⅱ的核心复合物示意图

A：光系统Ⅰ的核心复合物；B：光系统Ⅱ的核心复合物

CF_0－CF_1ATP 酶是由跨膜的 H^+ 通道 CF_0 和在类囊体膜基质侧起催化作用的 CF_1 两部分所组成(图 7－11)。在亚基组分、结构和功能上均与线粒体的 ATP 合成酶很相似。但两者也有不同的特性，叶绿体的 CF_1 的激活需有－SH

基化合物，如二硫苏糖醇，同时还需 Mg^{2+}。此外，寡霉素对 CF_1 无抑制作用。

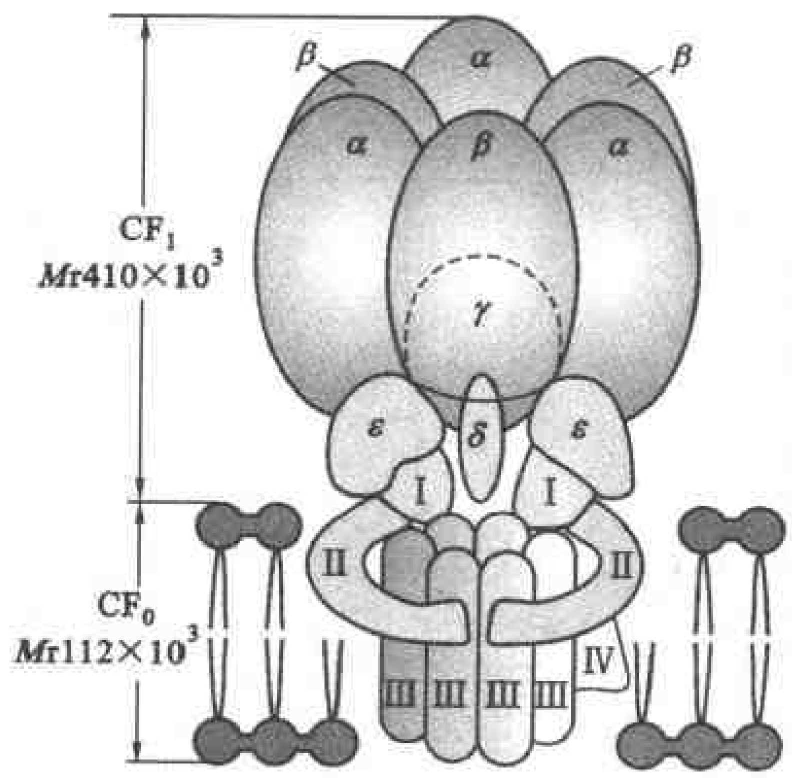


图 7-11　叶绿体的 ATP 合成酶结构示意图

这些复合物在类囊体膜中呈不对称分布。PSⅡ几乎全部分布在基粒与基质非接触区的膜中；PSⅠ主要分布在基粒与基质接触区及基质类囊体的膜中；细胞色素 bf 在类囊体膜上分布较为均匀；ATP 合成酶位于基粒与基质接触区及基质类囊体的膜中(图 7-12)。

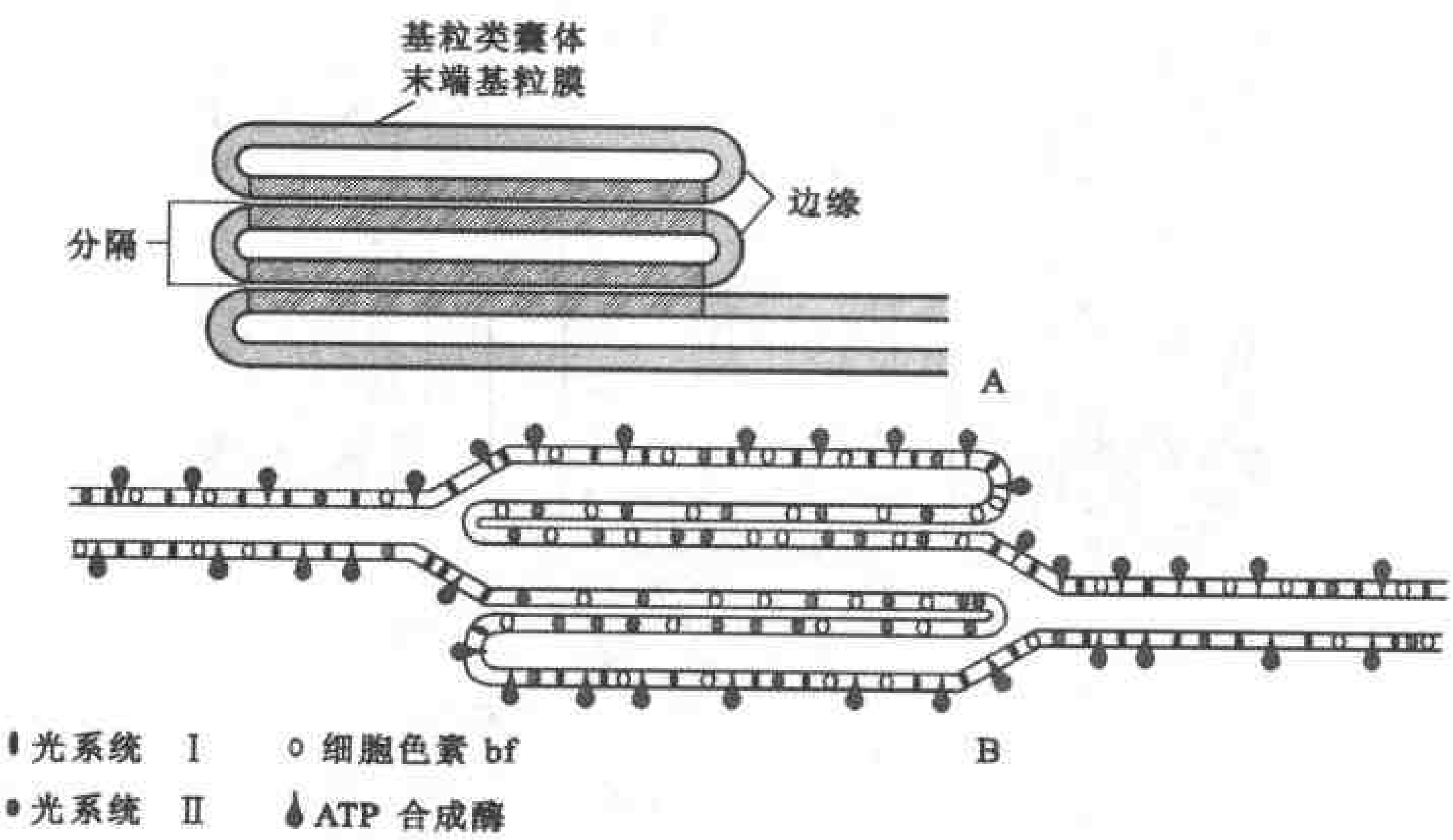


图 7-12　叶绿体类囊体膜的结构图解

A：示基粒类囊体膜的基质接触区(小点表示)与非接触区(斜线表示)；

B：光合作用的复合物在类囊体膜上的分布

2. 类囊体的化学组成

类囊体膜的主要成分是蛋白质和脂质(比例约 60:40)。脂质中主要是磷脂和糖脂,还有色素、醌化合物等。磷脂中有磷脂酰甘油(PG)和磷脂酰胆碱(PC)等,占类囊体膜总量的 10%左右;糖脂中主要有单半乳糖甘油二脂(MGDG),约占 40%;二半乳糖甘油二脂(DGDG),占 20%;硫脂(SQDG)等占 10% ~15%(非光合组织其含量极低)。色素(叶绿素、类胡萝卜素)占 20%~25%。脂质中的脂肪酸主要是不饱和的亚麻酸,约占 87%,因此类囊体膜的脂双分子层流动性较大。

类囊体膜的蛋白质可分为外在蛋白和内在蛋白两类。外在蛋白在类囊体膜的基质侧分布较多,CF_1 就是其中一种主要的外在蛋白,还有一些是与光反应有关的酶;内在蛋白现已发现有 20 余种多肽,相对分子质量介于 10×10^3~100×10^3 之间。已知的内在蛋白主要有:与 PSⅠ 和 PSⅡ 的活性有关的两种叶绿素-蛋白质复合物(chlorophyll-protein complex),即 CPⅠ 和 CPⅡ。CPⅠ 与 PSⅠ 的活性有关,占膜蛋白总量的 28%,其中叶绿素 a 含量较高,叶绿素 a 与叶绿素 b 之比为 12:1;CPⅡ 与 PSⅡ 的活性有关,是一种主要的叶绿素-蛋白质复合物,占膜蛋白总量的 50%,其中叶绿素 a 与叶绿素 b 之比为 1:1。此外,内在蛋白还有质体醌(plastoquinone, PQ)、细胞色素(cytochrome, Cyt)、质体蓝素(plastocyanin, PC)(含有铜的蛋白质)、铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)(属铁硫蛋白)以及黄素蛋白(铁氧还蛋白-$NADP^+$ 还原酶)等。

(三) 基质

叶绿体内膜与类囊体之间是流动性的基质,其中悬浮着片层系统。基质的主要成分是可溶性蛋白质和其他代谢活跃物质,其中核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, RuBPase)是光合作用中一个起重要作用的酶系统,亦是自然界含量最丰富的蛋白质,占类囊体可溶性蛋白质的 80%和叶片可溶性蛋白质的 50%。全酶由 8 个大亚基(LSU)和 8 个小亚基(SSU)组成,其中每个大亚基的相对分子质量约为 53×10^3,而小亚基的相对分子质量约为 14×10^3。已知酶的活性中心位于大亚基上,小亚基只具有调节功能。研究证实,大亚基是由叶绿体基因组编码,而小亚基则是由核基因组编码。基质中还含有环状 DNA(通常是靠近或附着在叶绿体内膜上)、RNA(rRNA、tRNA、mRNA)、核糖体、脂滴(Lipid droplet)或称嗜锇滴(osmiophilic droplet)(主要成分是亲脂性的醌类物质,可能是脂质的储存库)、植物铁蛋白(phytoferritin)(含铁的蛋白质,其功能是储存铁)和淀粉粒(stach grain)等。

三、叶绿体的主要功能——光合作用

叶绿体的主要功能是进行光合作用。绿色植物叶肉细胞的叶绿体吸收光能,利用水和二氧化碳合成糖类等有机化合物,同时放出氧的过程称为光合作用(photosynthesis)。光合作用是自然界将光能转换为化学能的主要途径。地球上

每年由植物捕获的太阳能至少可转化产生 4.2×10^{17}J 的自由能。

光合作用的过程包括很多复杂的反应，根据现代资料，光合作用的过程可分为三大步骤：① 原初反应；② 电子传递和光合磷酸化；③ 碳同化。这三步是一个连续的互相配合的过程，最终有效地将光能转换为化学能。光合作用的前两步属于光反应(light reaction)，它是在类囊体膜上由光引起的光化学反应，通过叶绿素等光合色素分子吸收、传递光能，并将光能转换为电能，进而转换为活跃的化学能，形成 ATP 和 NADPH 的过程。碳同化属于暗反应(dark reaction)，它是在叶绿体基质中进行的不需光(也可在光下)的酶促化学反应，利用光反应产生的 ATP 和 NADPH，使 CO_2 还原为糖类等有机物，即将活跃的化学能最后转换为稳定的化学能，积存于有机物中。

值得指出的是，光反应和暗反应不是绝对的，光反应仅在原初反应开始的瞬间需要光，其后的电子传递和光合磷酸化反应是不需要光的；而碳同化的暗反应中的 CO_2 还原成糖的过程虽然不需要光，但催化其反应的某些酶(如甘油醛磷酸脱氢酶等)还是需要光来激活。

(一) 原初反应

原初反应(primary reaction)是指叶绿素分子从被光激发至引起第一个光化学反应为止的过程，包括光能的吸收、传递与转换，即光能被捕光色素分子吸收，并传递至反应中心，在反应中心发生最初的光化学反应，使电荷分离从而将光能转换为电能的过程(图 7－13)。

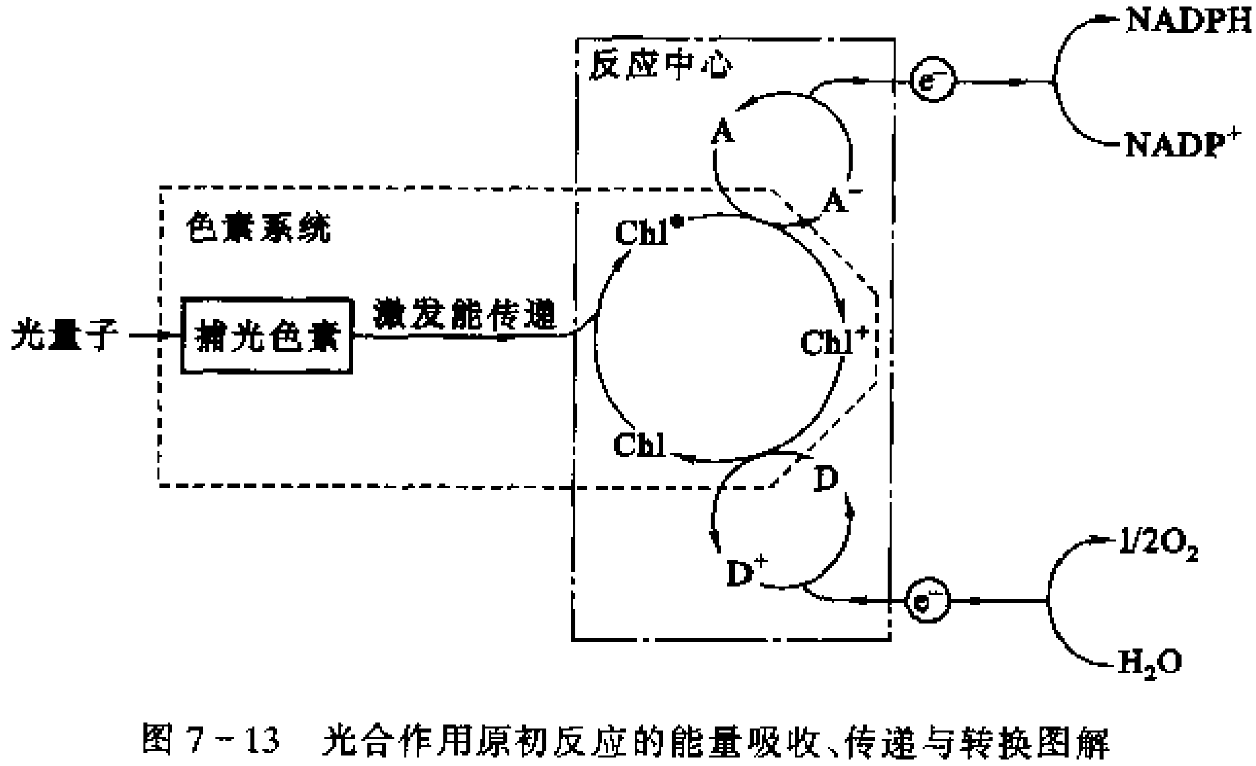


图 7－13 光合作用原初反应的能量吸收、传递与转换图解
Chl 为反应中心色素分子；D 为原初电子供体；A 为原初电子受体

在绿色植物中，吸收光能的主要分子是叶绿素(chlorophyll)，包括叶绿素 a 和叶绿素 b；另一类色素分子是类胡萝卜素(carotenoid)，包括胡萝卜素(carotene)和叶黄素(xanthophyll)。在一些细菌和藻类中还有藻胆素(phycobilin)和叶绿素 c 或 d 等。这些色素分子按其作用可分为两类：一类为捕光色素

(light harvesting pigment),这类色素只具有吸收聚集光能和传递激发能给反应中心的作用,而无光化学活性,故又称为天线色素(antenna pigment),由全部的叶绿素 b 和大部分的叶绿素 a、胡萝卜素及叶黄素等所组成。另一类属反应中心色素 (reaction centre pigment),由一种特殊状态的叶绿素 a 分子组成,按最大吸收峰的不同分为两类:吸收峰为 700 nm 者称为 P700,为 PSⅠ的中心色素;吸收峰为 680 nm 者称为 P680,为 PSⅡ的中心色素。它们既是光能的捕捉器,又是光能的转换器,具有光化学活性,可将光能转换为电能。

捕光色素及反应中心构成了光合作用单位(photosynthetic unit),它是进行光合作用的最小结构单位。反应中心由一个中心色素分子 Chl 和一个原初电子供体 D 及一个原初电子受体 A 组成。反应中心的基本成分是蛋白质和脂质,数量很少的叶绿素 a 分子与这些脂蛋白结合,有序地排列在片层结构上,形成特殊状态的非均一系统。反应中心色素的最大特点是,在直接吸收光量子或从其他色素分子传递来的激发能被激发后,产生电荷分离和能量转换。

在原初反应过程中,捕光色素分子吸收的光能通过共振机制极其迅速地(10^{-10} s)传递给反应中心的中心色素分子 Chl,Chl 被激发而成激发态 Chl^*,同时放出电子给原初电子受体 A,这时 Chl 被氧化为带正电荷的 Chl^+,而 A 被还原为带负电荷的 A^-。氧化的 Chl^+ 又可从原初电子供体 D 获得电子而恢复为原来状态的 Chl,原初电子供体 D 则被氧化为 D^+。这样不断地氧化还原,就不断地把电子传递给原初电子受体 A,这就完成了光能转换为电能的过程,结果是 D 被氧化而 A 被还原。此过程可归纳如下:

$$D \cdot Chl \cdot A \xrightarrow{h\nu} D \cdot Chl^* \cdot A \rightarrow D \cdot Chl^+ \cdot A^- \rightarrow D^+ \cdot Chl \cdot A^-$$

(二) 电子传递和光合磷酸化

1. 电子传递

实验证明,光合作用的电子传递是在两个不同的光系统中进行的,即由 PSⅠ及 PSⅡ协同完成。PSⅡ把电子从低于 H_2O 的能量水平提高到一个中间点(midway point),而 PSⅠ又把电子从中间点提高到高于 $NADP^+$ 的水平,这两个光系统的反应是接力进行的。

当阳光照射到类囊体膜上时,能量同时被 PSⅡ和 PSⅠ的捕光色素吸收,并分别传递给各自的反应中心 P680 和 P700,两个反应中心的电子被同时激发而传给各自的原初电子受体;在 PSⅡ的反应中心产生一种强的氧化剂 $P680^+$ 和一种弱的还原剂 Ph^-(脱镁叶绿素,为原初电子受体);$P680^+$ 通过 Z(Tyr 残基)和 Mn 中心夺取水中的电子供给 Ph^-,H^+ 释放到类囊体腔中,同时导致 O_2 的形成;电子从 Ph^- 传递给与 D_1 结合的质体醌 Q_A,Q_A 将电子传给另一个质体醌 Q_B;Q_B 在接受 2 个电子后,成为还原态 Q_B^{2-},这时,Q_B^{2-} 从基质中吸收 2 个 H^+ 形成 PQH_2,还原态 PQH_2 即从核心复合物上解离下来,而新的氧化态 PQ 则从类囊体膜中的 PQ 库中得到补充(图 7 - 10B);解离下来的 PQH_2 将电子传给

Cytbf,而 H^+ 释放到类囊体腔,产生 H^+ 梯度;Cytbf 将电子传给质体蓝素(PC),PC 又将电子传给带正荷的 $P700^+$。在 PS Ⅰ 的反应中心产生一种强的还原剂 A_0^-(A_0^- 是一种特殊状态的叶绿素 a,为原初电子受体)和一种弱的氧化剂 $P700^+$,$P700^+$ 从还原的质体蓝素(PC)捕获电子变成 P700,可再一次激发出电子;高能电子从 A_0^- 经 A_1 和铁硫蛋白(FeS)传给铁氧还蛋白(Fd)(图 7-10A),在 NADP 还原酶的参与下,$NADP^+$ 从 Fd 接受电子的同时,从基质中吸收一个 H^+ 而还原为 NADPH。这两个光系统互相配合,利用所吸收的光能把一对电子从水传递给 $NADP^+$。现在公认,电子的传递路线呈"Z"形(图 7-14)故称为"Z"链或光合链(photosynthetic chain),它通过一些电子传递体将两个原初光化学反应联系起来。这些电子传递体可按氧化还原电位顺序进行排列,负值越大代表还原势越强,正值越大代表氧化势越强,电子定向转移。光合链中的电子传递体是质体醌(PQ)、细胞色素 bf(Cytbf)、和质体蓝素(PC)等。其中 PQ 的数量最多(菠菜叶绿体内 PQ 含量达全叶绿素的 1/7),同时它既可传递电子,又可传递质子,在光合电子传递链中起着重要的作用。

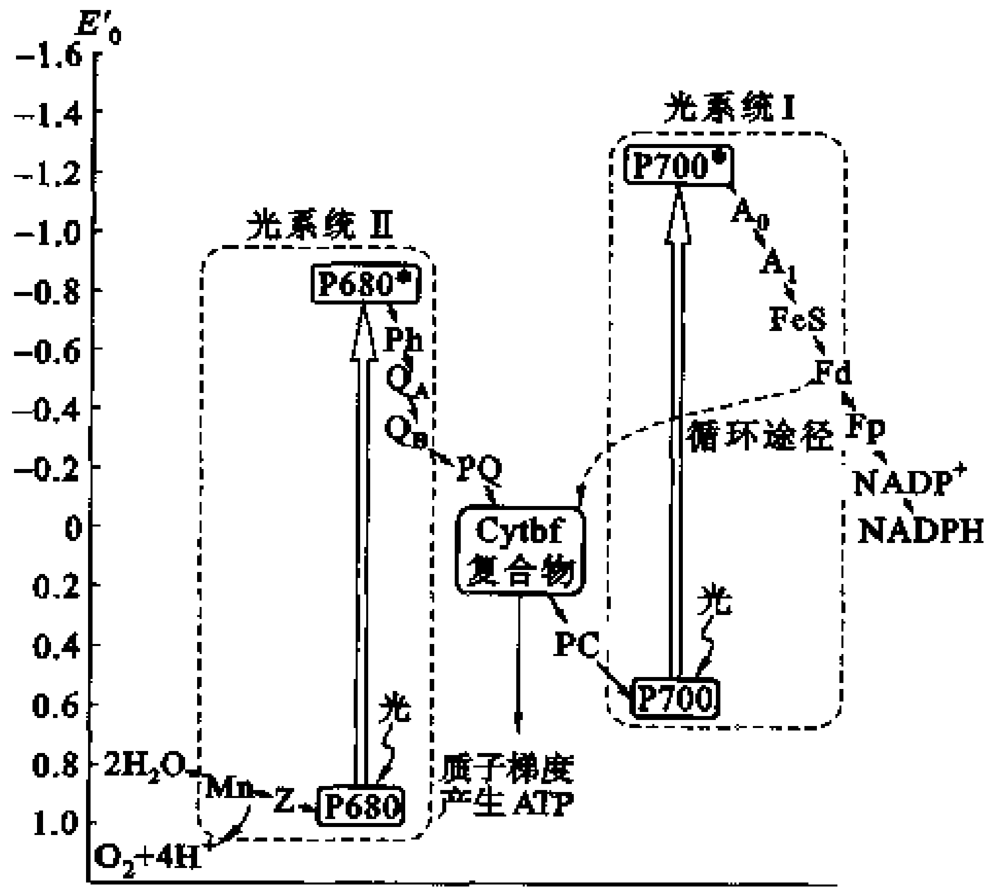


图 7-14　光合作用中的两个光系统和电子传递途径

光合链中的电子传递体在类囊体膜上的空间分布是不对称的,有的接近膜表面,有的深埋膜中。PSⅡ 的放氧一端位于类囊体膜的内侧,因此水的光解放出的 O_2 和 H^+ 进入类囊体腔,PS Ⅰ 的 $NADP^+$ 还原一端位于类囊体膜的外侧,因此 $NADP^+$ 被还原生成的 NADPH 进入叶绿体基质。PQ 是亲脂分子,位于膜的脂双分子层中,可在流动的膜中迅速地扩散,它在膜的外侧接受电子和 H^+ 被还原,而在膜的内侧放出电子和 H^+ 被氧化,因此,伴随着电子传递,把类囊体膜外的 H^+ 不断地转运到类囊体腔中,使膜内外两侧形成 H^+ 浓度差。PC 位于膜的

内表面,Fd 位于膜的外表面,它们在膜中易流动,可沿膜的内外表面迅速扩散。虽然 PSⅡ 与 PSⅠ 在类囊体膜中是分隔分布的,但电子还是能顺利的从 PSⅡ 传递到 PSⅠ。

2. 光合磷酸化

由光照所引起的电子传递与磷酸化作用相偶联而生成 ATP 的过程,称为光合磷酸化(photophosphorylation)。光合磷酸化作用是与光合链电子传递相偶联的,没有光合链的电子传递,就没有光合磷酸化,电子传递在前,磷酸化作用在后,磷酸化的存在,又可促进电子传递。已知呼吸作用消耗有机物,通过氧化磷酸化作用形成 ATP。光合作用通过光合磷酸化由光能形成 ATP,光合作用把 CO_2 同化为能量高的有机物质,也就是靠 ATP 和 NADPH 的"换能"作用来完成的。

(1) 光合磷酸化的类型

按照电子传递的方式可将光合磷酸化分为非循环式和循环式两种类型。

非循环式光合磷酸化:PSⅡ 接受红光后,激发态 $P680^*$ 从水光解得到电子,传递给 $NADP^+$,电子传递经过两个光系统,在传递过程中产生的 H^+ 梯度驱动 ATP 的形成。在这个过程中,电子传递是一个开放的通道,故称为非循环式光合磷酸化(noncyclic photophosphorylation)(图 7-14)。它包括 PSⅠ 和 PSⅡ,其产物除 ATP 外,还有 NADPH(在绿色植物)或 NADH(在光合细菌)。目前比较公认的非循环式光合磷酸化有两个部位:H_2O 与 PQ 之间,PQ 与 Cytbf 之间。两个部位的 ATP/O 均为 0.6,加起来 ATP/O 为 1.2。每放出 1 分子 O_2 只能形成 2.4 个 ATP 分子,但每同化一个分子 CO_2 需要 3 个分子的 ATP,因此非循环式光合磷酸化达不到形成 3 个分子 ATP 的要求,这就需要循环式光合磷酸化形成的 ATP 来补充,推动 CO_2 的同化过程。

循环式光合磷酸化:PSⅠ 接受远红光后,产生的电子经过 A_0、A_1、FeS 和 Fd,又传给 Cytbf 和 PC 而流回到 PSⅠ(图 7-14)。电子循环流动,产生 H^+ 梯度,从而驱动 ATP 的形成。这种电子的传递是一个闭合的回路,故称为循环式光合磷酸化(cyclic photophosphorylation)。在整个过程中,只有 ATP 的产生,不伴随 NADPH 的生成,PSⅡ 也不参加,所以不产生氧。当植物缺乏 $NADP^+$ 时,就会发生循环式光合磷酸化。

(2) 光合磷酸化的作用机制

在类囊体膜中,呼吸链的各组分均按一定的顺序排列,呈不对称分布。当两个光系统发生原初反应时,类囊体腔中的水分子发生光解,释放出氧分子、质子和电子,引起电子从水传递到 $NADP^+$ 的电子流。P680 分子吸收光量子后,激发出的电子,经 Q 传至膜外侧的电子受体 PQ;PQ 接受电子,并从基质中摄取 2 个质子,还原为 PQH_2;PQH_2 移到膜的内侧,将 2 个质子释放到类囊体腔中,而把电子交给细胞色素 bf,随后又经位于膜内侧的质体蓝素(PC),把电子传递给 P700;P700 分子吸收光量子后,放出电子,被铁硫蛋白(4Fe-4S)所接受,随即又传给位于膜外侧的铁氧还蛋白(Fd),最后,将电子交给 $NADP^+$,使之还原成

NADPH(图 7 - 15)。因此,在上述所有的电子传递体中,PQ 既是电子载体又是质子载体,通过 PQ 的氧化与还原,使 H^+ 从膜外侧进入膜内侧,水的光解所产生的 H^+ 也留在膜内侧,结果使膜内侧的 H^+ 浓度增加,因而,形成了类囊体膜内外两侧的 H^+ 浓度差。由于在膜两侧存在质子电动势差,而推动 H^+ 通过膜中的 CF_0 而到膜外的 CF_1 发生磷酸化作用,使 ADP 与 Pi 形成 ATP。CF_1 在类囊体膜的基质侧,所以新合成的 ATP 立即被释放到基质中。同样光系统 I 所形成的 NADPH 也在基质中,这样光合作用的光反应产物 ATP 和 NADPH 都处于基质中,便于被随后进行的碳同化的暗反应所利用。

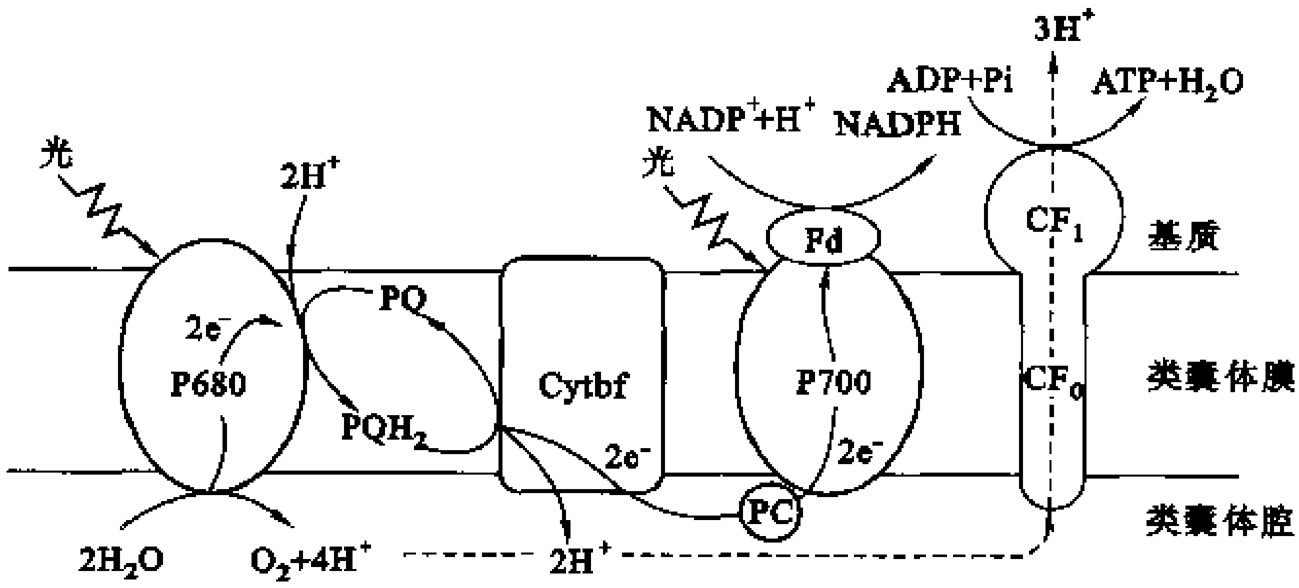


图 7 - 15 叶绿体类囊体膜中进行光合磷酸化的图解

由上述可知,叶绿体中 ATP 合成的机制与线粒体的十分相似。在光合磷酸化和氧化磷酸化中,ATP 的形成都是由 H^+ 移动所推动的;叶绿体的 CF_1 因子与线粒体的 F_1 因子都具有催化 ADP 和 Pi 形成 ATP 的作用;在光合磷酸化和氧化磷酸化中都需要完整的膜等。但两者又有所不同,叶绿体中通过 1 对电子的 2 次穿膜传递,在基质中摄取 3 个 H^+,在类囊体腔中产生 4 个 H^+,每 3 个 H^+ 穿过 CF_1-CF_0ATP 酶,生成 1 个 ATP 分子;而在线粒体中,1 对电子 3 次穿膜传递,将基质中的 3 对 H^+ 抽提到膜间隙中,每 2 个 H^+ 穿过 F_1-F_0ATP 酶,生成 1 个 ATP 分子。

(三)光合碳同化

二氧化碳同化(CO_2 assimilation)是光合作用过程中的一个重要方面。从能量转换角度讲,碳同化是将光反应所生成的 ATP 和 NADPH 中的活跃的化学能,转换为贮存在糖类中稳定的化学能的过程。现已阐明,高等植物的碳同化有三条途径:卡尔文循环、C_4 途径和景天科酸代谢途径。其中卡尔文循环是碳同化最重要最基本的途径,只有这条途径才具有合成淀粉等产物的能力。其他两条途径只能起固定和转运 CO_2 的作用,不能单独形成淀粉等产物。

1. 卡尔文循环

卡尔文循环(Calvin cycle)固定 CO_2 的最初产物是 3 - 磷酸甘油酸(三碳化

合物),故也称 C_3 途径。这是 50 年代卡尔文(Calvin)等人应用 $^{14}CO_2$ 示踪方法所进行的著名实验研究。由于 Calvin 在光合碳同化途径上作出了重大贡献,因此获得了 1961 年诺贝尔化学奖。C_3 途径是所有植物进行光合碳同化所共有的基本途径。它包括一系列复杂的反应,但可简化为 3 个阶段,即羧化、还原和 RuBP 再生阶段。

羧化阶段:CO_2 在被 NADPH 的 H^+ 还原之前,必须经过羧化阶段,固定成羧酸,然后才被还原。核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)是 CO_2 的接受体,在 RuBP 羧化酶的催化下,CO_2 与 RuBP 反应形成 2 分子 3-磷酸甘油酸(PGA)。

还原阶段:PGA 在 3-磷酸甘油酸激酶催化下被 ATP 磷酸化,形成 1,3-二磷酸甘油酸,然后在甘油醛磷酸脱氢酶催化下被 NADPH 还原形成 3-磷酸甘油醛。这一阶段是一个吸能反应,光反应中形成的 ATP 和 NADPH 主要是在这一阶段被利用。所以,还原阶段是光反应与暗反应的连接点。一旦 CO_2 被还原成 3-磷酸甘油醛,光合作用的贮能过程便完成。

RuBP 再生阶段:利用已形成的 3-磷酸甘油醛经一系列的相互转变,最终再生成 5-磷酸核酮糖。然后在磷酸核酮糖激酶的催化下发生磷酸化作用形成 RuBP,再消耗一分子 ATP。综上所述,C_3 途径是靠光反应合成的 ATP 及 NADPH 作能源,推动 CO_2 的固定、还原。每循环一次只能固定一个 CO_2 分子,循环六次才能把 6 个 CO_2 分子同化成一个己糖分子。

2. C_4 途径

20 世纪 60 年代发现,某些热带或亚热带起源的植物中,除了具有卡尔文循环外,还存在着另一个独特的固定 CO_2 的途径,它们固定 CO_2 的最初产物是草酰乙酸(四碳化合物),所以称为四碳植物(C_4 植物),如甘蔗、玉米、高粱等。其主要特点是:在叶脉周围有一圈含叶绿体的维管束鞘细胞,其外面又环列着叶肉细胞。C_4 植物对 CO_2 的净固定是由这两类细胞密切配合而完成的,其利用 CO_2 的效率特别高,即使 CO_2 浓度很低时,还可固定 CO_2。因此,这类植物积累干物质的速度很快,为高产型植物。C_4 植物固定 CO_2 的途径称为 C_4 途径(C_4 pathway)或 Hatch-Slack 循环。

3. 景天科酸代谢

生长在干旱地区的景天科(Crassulaceae)等肉质植物的叶子,气孔白天关闭,夜间开放,因而夜间吸进 CO_2,在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)催化下,与磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)结合,生成草酰乙酸,进一步还原为苹果酸。白天 CO_2 从贮存的苹果酸中经氧化脱羧释放出来,参与卡尔文循环,形成淀粉等。所以植物体在夜间有机酸含量很高,而糖含量下降;白天则相反,有机酸含量下降,而糖分增多。这种有机酸日夜变化的类型,称为景天科酸代谢(crassulaceae acid metabolism,CAM)。这些植物称为 CAM 植物,如景天,落地生根等。CAM 途径与 C_4 途径相似,只是 CO_2 固定与光合作用产物的生成,在时间及空间上与 C_4 途径不同。

第三节　线粒体和叶绿体是半自主性细胞器

1960 年以前，普遍认为 DNA 只存在于细胞核中。1962 年 Ris 和 Plant 在衣藻叶绿体中发现有 DNA；1963 年 M. Nass 和 S. Nass 在鸡胚肝细胞线粒体中也发现有 DNA；以后又陆续从叶绿体和线粒体中分离出 DNA。

进一步研究发现，线粒体和叶绿体中还有 RNA(mRNA、tRNA、rRNA)、核糖体、氨基酸活化酶等。说明这两种细胞器均有自我繁殖所必需的基本组分，具有独立进行转录和翻译的功能。迄今为止，已知线粒体基因组仅能编码约 20 种线粒体膜和基质蛋白并在线粒体核糖体上合成；叶绿体仅有 60 多种特有的蛋白质是在叶绿体内合成的。但参与组成线粒体和叶绿体的蛋白质各有上千种之多。显而易见，线粒体和叶绿体的绝大多数蛋白质是由核基因编码，在细胞质核糖体上合成，然后转移至线粒体或叶绿体内。这些蛋白质与线粒体或叶绿体 DNA 编码的蛋白质协同作用。可以说，细胞核与发育成熟的线粒体和叶绿体之间存在着密切的、精确的、严格调控的生物学机制。在二者协同作用的关系中，细胞核的功能更重要，一方面它提供了绝大部分遗传信息；另一方面它具有关键的控制功能。也就是说，线粒体和叶绿体的自主程度是有限的，它们对核遗传系统有很大的依赖性。因此，线粒体和叶绿体的生长和增殖是受核基因组及其自身的基因组两套遗传系统的控制，所以称为半自主性细胞器(semiautonomous organelle)。

一、线粒体和叶绿体的 DNA

线粒体 DNA(mtDNA)呈双链环状，与细菌的 DNA 相似。一个线粒体中可有 1 个或几个 DNA 分子。各种生物的 mtDNA 大小不一样，大多数动物细胞 mtDNA 的周长约为 5 μm，约含 16 000 bp，相对分子质量为 $100\ 000\times10^3$，比核 DNA 相对分子质量小 100～1 000 倍；酵母 mtDNA 的周长可达 26 μm，有 78 000 bp；人 mtDNA 有 16 569 bp，这是迄今为止所知最小的 mtDNA，其一级结构的序列分析已全部完成，含有 37 个结构基因。叶绿体 DNA(ctDNA)也呈双链环状，其大小差异较大(200 000～2 500 000 bp)。ctDNA 一般周长为 40～60 μm，相对分子质量约为 $38\ 000\times10^3$。在已测定 ctDNA 长度的物种中，刺松藻的最小，只有 85 000 bp，而衣藻的最大，达 292 000 bp；大型绿藻地中海伞藻的叶绿体基因组，比其他藻类和高等植物的都要复杂，其 DNA 相对分子质量约为 $150\ 000\times10^3$，相当于 2.0×10^6 bp 左右。叶绿体中 DNA 的含量大体在 1×10^{-14}g 水平上，明显的比线粒体中 DNA 含量(1×10^{-16}g)多。每个线粒体中约含 6 个mtDNA分子，每个叶绿体中约含 12 个 ctDNA 分子。

mtDNA 和 ctDNA 均可自我复制，其复制也是以半保留方式进行的。用^{3}H－嘧啶核苷标记证明，mtDNA 复制的时间主要在细胞周期的 S 期及 G_2 期，

DNA 先复制，随后线粒体分裂。ctDNA 复制的时间在 G_1 期。它们的复制仍受核的控制，复制所需的 DNA 聚合酶是由核 DNA 编码，在细胞质核糖体上合成的。

二、线粒体和叶绿体的蛋白质合成

线粒体和叶绿体虽能合成蛋白质，但其种类十分有限。迄今已知，mtDNA 编码的 RNA 和多肽有：线粒体核糖体中 2 种 rRNA(12*S* 及 16*S*)，22 种 tRNA，13 种多肽(每种约含 50 个氨基酸残基)。这些多肽分布为：复合物 Ⅰ 中 7 个亚基，复合物Ⅲ中 1 个亚基，复合物Ⅳ中 3 个亚基，F_0 中 2 个亚基。这些都是线粒体核糖体所合成的重要蛋白质。从用酵母进行的实验中(表 7－3)可以看出，线粒体核糖体合成的蛋白质只占少数，其中装配在内膜酶复合物的仅有 8 种蛋白质，装配在核糖体的只有 1 种。就酶复合物的组成成分而论，它们是由线粒体和细胞质两者合成的蛋白质所组成。组成线粒体各部分的蛋白质，绝大多数都是由核 DNA 编码并在细胞质核糖体上合成后再运送到线粒体各自的功能位点上。例如，细胞色素 b_2 和 c 是膜间隙的组成蛋白，$F_1\beta$ 是基质的组成蛋白，细胞色素氧化酶是内膜的组成蛋白等，都是在细胞质中合成前体后转移到线粒体中的。正因如此，线粒体的遗传系统仍然要依赖于细胞核的遗传系统。

表 7－3 酵母线粒体的主要酶复合物的生物合成

酶复合物	总数	亚基数目	
		胞质核糖体合成	线粒体核糖体合成
细胞色素氧化酶	7	4	3
细胞色素 bc_1 复合物	7	6	1
ATP 酶	9	5	4
核糖体大亚单位	30	30	0
核糖体小亚单位	22	21	1

不同来源的线粒体基因，其表达产物既有共性，也存在差异(表 7－4)。例如，粗糙脉孢菌和植物的 mtDNA 编码 NADH－CoQ 还原酶复合物中的 6 个亚基，但在酵母中这些亚基却是由核 DNA 编码的；反之，酵母和植物 mtDNA 中有编码 ATP 合成酶 F_0 亚基 9 的序列，在哺乳动物和粗糙脉孢菌中，这个亚基是由核 DNA 编码的。植物 mtDNA 的大小和变化程度，都与其他 mtDNA 有很大的不同。它们含有的少数基因是其他 mtDNA 所没有的，例如，线粒体的 5SRNA，ATP 合成酶 F_1 的 α 亚基。与动物和真菌线粒体相比，植物线粒体的核糖体 RNAs 要大得多。

参加叶绿体组成的蛋白质来源有 3 种：① 由 ctDNA 编码，在叶绿体核糖体上合成；② 由核 DNA 编码，在细胞质核糖体上合成；③ 由核 DNA 编码，在叶绿体核糖体上合成。由 ctDNA 编码的 RNA 和多肽有：叶绿体核糖体中的 4 种

rRNA(23S、16S、4.5S 及 5S)，30 种(烟草)或 31 种(地钱)tRNA，约 90 种多肽。Keegstra(1989)认为类囊体中至少有 50 种多肽，可能有一半是叶绿体自己合成的。目前在各种植物的叶绿体中已确定了 20 个电子传递和光合固氮的基因：编码 RuBP 羧化酶的大亚基，PSⅠ的 2 个亚基，PSⅡ的 8 个亚基，ATP 合成酶的 6 个亚基，细胞色素 b/f 复合物的 3 个亚基，这些都是叶绿体核糖体所合成的重要蛋白质。仅就叶绿体核糖体而言，叶绿体 rRNA 是叶绿体基因的产物，而参加组成核糖体的蛋白质，则既有核基因的产物也有叶绿体基因的产物。70S 核糖体含有 58～62 种蛋白质，其中只有 1/3 是由叶绿体基因组编码的，即组成叶绿体的绝大多数蛋白质都是来自细胞质，估计至少 70% 的叶绿体蛋白质是由核基因组编码的。

表 7－4 不同来源的线粒体 DNA 大小及其表达产物

	动物	酵母	真菌(脉孢菌属)	植物
线粒体 DNA 大小/kb	14～18	78	19～108	200～2 500
表达产物：				
复合物Ⅰ(NADH－C_0Q 还原酶)				
亚基数	7	0	6	6
复合物Ⅲ(C_0Q－细胞色素 c 还原酶)				
细胞色素 b	+	+	+	+
复合物Ⅳ(细胞色素氧化酶)				
亚基 1、2、3	+	+	+	+
ATP 合成酶的 F_0 部分				
亚基 6	+	+	+	+
亚基 8	+	+	+	+
亚基 9	－	+	－	+
ATP 合成酶的 F_1 部分				
亚基 α	－	－	－	+
rRNAs				
大亚基	16S	21S	21S	26S
小亚基	12S	15S	15S	18S
5SRNA	－	－	－	+
tRNAs	22	23～25	23～25	≈30

有趣的是，有人认为核基因编码细胞器蛋白质是生物进化的结果，提出在有花植物进化过程中有些编码细胞器蛋白质的基因是从细胞器转移到核中的。如 mtDNA 中的 *cox* Ⅱ基因编码细胞色素氧化酶复合物的亚基Ⅱ，还有叶绿体蛋白质基因 *tufA* 和 *rp*122 等都是在进化过程中从细胞器转移到核中的。通过 DNA 杂交和序列分析，在动物和植物中都可发现核 DNA 内随机地插有 mtDNA 短的片段(约 50 bp)，它们并未编码任何蛋白质。这提示在进化过程中，基因可能从线粒体转移至核中。有些植物线粒体基因组还可发现含有叶绿体的 DNA 序列(如二磷酸核酮糖羧化酶的基因片段)，这说明在两种细胞器间也可能有 DNA 的转移。

三、线粒体和叶绿体蛋白质的运送与装配

由核基因编码，在细胞质核糖体上合成的线粒体和叶绿体蛋白，需运送至线粒体和叶绿体各自的功能部位上进行更新或装配。核基因编码的蛋白向线粒体跨膜运送与糙面内质网合成的分泌蛋白不同，前者先合成前体形式，然后通过后转移运输到线粒体内，而后者则是通过边翻译边转移的共转移方式实现跨膜运输的。前体蛋白由成熟形式(mature form)的蛋白和 N 端的一段称为导肽(leader sequences，leader peptide，precursor chain)的序列共同组成。现已有 40 多种线粒体蛋白质导肽的一级结构已阐明，它们约含 20～80 个氨基酸残基。导肽的结构有以下特征：① 含有丰富的带正电荷的碱性氨基酸，特别是精氨酸，带正电荷的氨基酸残基有助于前导肽序列进入带负电荷的基质中；② 羟基氨基酸如丝氨酸含量也较高；③ 几乎不含带负电荷的酸性氨基酸；④ 可形成既具亲水性又具疏水性的 α 螺旋结构，这种结构特征有利于穿越线粒体的双层膜。导肽内不仅含有识别线粒体的信息，并且有牵引蛋白质通过线粒体膜进行运送的功能。导肽可比喻为“火车头”，被牵引的蛋白质犹如“车厢”，导肽决定运送的方向，它对被运送的蛋白质并无特异性要求。

含导肽的前体蛋白在跨膜运送时，首先被线粒体表面的受体识别，同时还需要位于外膜上的 GIP 蛋白(general insertion protein)的参与，它能促进线粒体前体蛋白从内外膜的接触点通过内膜。电镜观察证实，线粒体内外膜之间确实存在这样的接触点。内膜两侧的膜电位 $\Delta\Psi$ 对前体蛋白进入内膜起着启动作用，但转运过程的完成并不一定依靠 $\Delta\Psi$。前体蛋白在跨膜运送之前需要解折叠为松散的结构，以利跨膜运送。前体蛋白在通过内膜之后，其导肽即被基质中的线粒体导肽水解酶(mitochondrial processing peptidase，MPP)与导肽水解激活酶(processing enhancing protein，PEP)水解，并同时重新卷曲折叠为成熟的蛋白质分子。跨膜运送的蛋白质在解折叠(unfolding)与重折叠(refolding)的过程中都需要某些被称为“分子伴侣”(molecular chaperone)的分子参与。分子伴侣具有解折叠酶(unfoldase)的功能，并能识别蛋白质解折叠之后暴露出的疏水面并与之结合，防止相互作用产生凝聚或错误折叠，同时还参与蛋白质跨膜运送后分子的重折叠以及装配(assembly)过程。分子伴侣的这种作用没有专一性。分子伴侣很大一部分是属于热休克蛋白(heat shock protein，Hsp)，在进化上十分保守，广泛存在于各种生物体内。其相对分子质量一般都在 60×10^3 以上，Hsp70 的相对分子质量为 70×10^3，Hsp60 的相对分子质量为 60×10^3。在正常生理条件下，Hsp 对蛋白质跨膜运送及复合物的装配起着重要作用，在运送通过内膜的过程中还需消耗能量。水解 ATP 释放的能量可能用以帮助蛋白质解折叠以及进入线粒体基质后促使输入的蛋白质与分子伴侣复合物分离。

研究表明，跨膜转运过程是单向进行的，完成这一转运过程需要分子伴侣，它们能解开细胞质内前体蛋白(precursor protein)折叠的结构域，牵拉多肽链穿

膜而过。线粒体基质 Hsp70(mHsp70)可与进入线粒体腔的导肽交联。为了解释这一作用机制,Simon 等提出布朗棘轮模型(Brownian rachet model)。该模型认为,在蛋白质转运孔道内,多肽链做布朗运动摇摆不定,一旦前体蛋白进入线粒体腔,立即有一分子 mHsp70 结合上去,这样就防止了前导肽退回细胞质,随着肽链进一步伸入线粒体腔,肽链会结合更多的 mHsp70 分子。mHsp70 可拖拽肽链,要拖拽肽链,mHsp70 必须同时附着在肽链和线粒体膜上。这样的排列方式使 mHsp70 通过改变构象即可产生拖力。首先 mHsp70 以一种高能构象结合导肽,然后松弛为一种低能构象,促使导肽进入线粒体腔,并迫使后面的肽链解链以进入转运孔道。这种假说将 mHsp70 描绘为转运发动机,类似于肌球蛋白和驱动蛋白的牵拉作用。

基因融合实验证明,导肽的不同片断含有不同的导向信息,不同的导肽所含的信息不同,可使不同的线粒体蛋白质运送至线粒体的基质中,或定位于内膜或膜间隙。如定位于线粒体基质中的蛋白,其导肽的 N 端带正电荷,含有导向基质的信息。在跨膜转运时,首先在细胞质 Hsp70 的参与下解折叠为伸展状态,然后与膜受体结合并在接触点处通过线粒体膜进入基质,其导肽即被基质中的蛋白水解酶水解,成为成熟的蛋白质(图 7-16)。

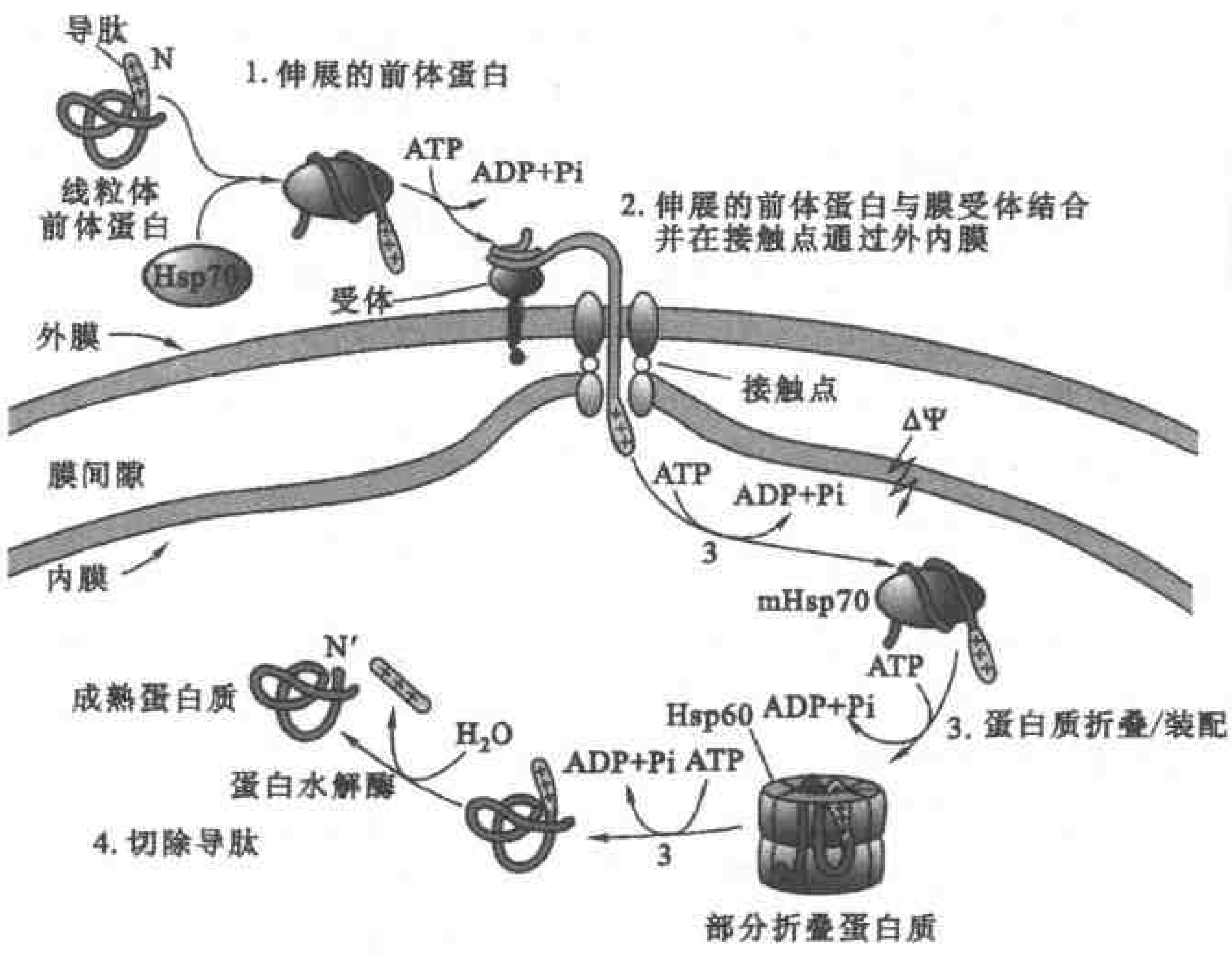


图 7-16　线粒体蛋白跨膜转运过程图解
(引自 Gerald Karp,1999)

蛋白质进入线粒体的部位是由其导肽所含信息决定的。但是,并非所有线粒体蛋白质合成时都含有导肽。例如,外膜蛋白 Porin,内膜蛋白 ADP/ATP 载

体,基质中的 3－氧酰基－CoA 硫解酶(3－oxoacyl－CoA thiolase)等。有人认为这些蛋白的靶向信息很可能蕴藏于这些分子内的氨基酸序列中。

叶绿体蛋白质的运送及装配与线粒体有许多类同之处。细胞质中合成的叶绿体前体蛋白,在 N 端也含有一个额外的氨基酸序列,称为转运肽(transit peptides,or transit sequences)。这种转运肽对叶绿体蛋白质的运送是必要的,它不仅牵引叶绿体蛋白,而且可牵引外源蛋白。目前研究得较多的是类囊体膜和类囊体腔中蛋白质的运送过程。如捕光色素蛋白或称叶绿素 a/b 结合蛋白(chlorophyll a/b binding protein)前体,它的转运肽含有 35 个氨基酸残基,能引导其穿过叶绿体膜进入基质,在基质中由特异的蛋白酶加工切去转运肽成为成熟蛋白质。成熟的捕光色素蛋白如何插入类囊体膜,不是由转运肽决定的,捕光色素蛋白整合到类囊体膜上的信息是在成熟蛋白C端的跨膜区域。重组实

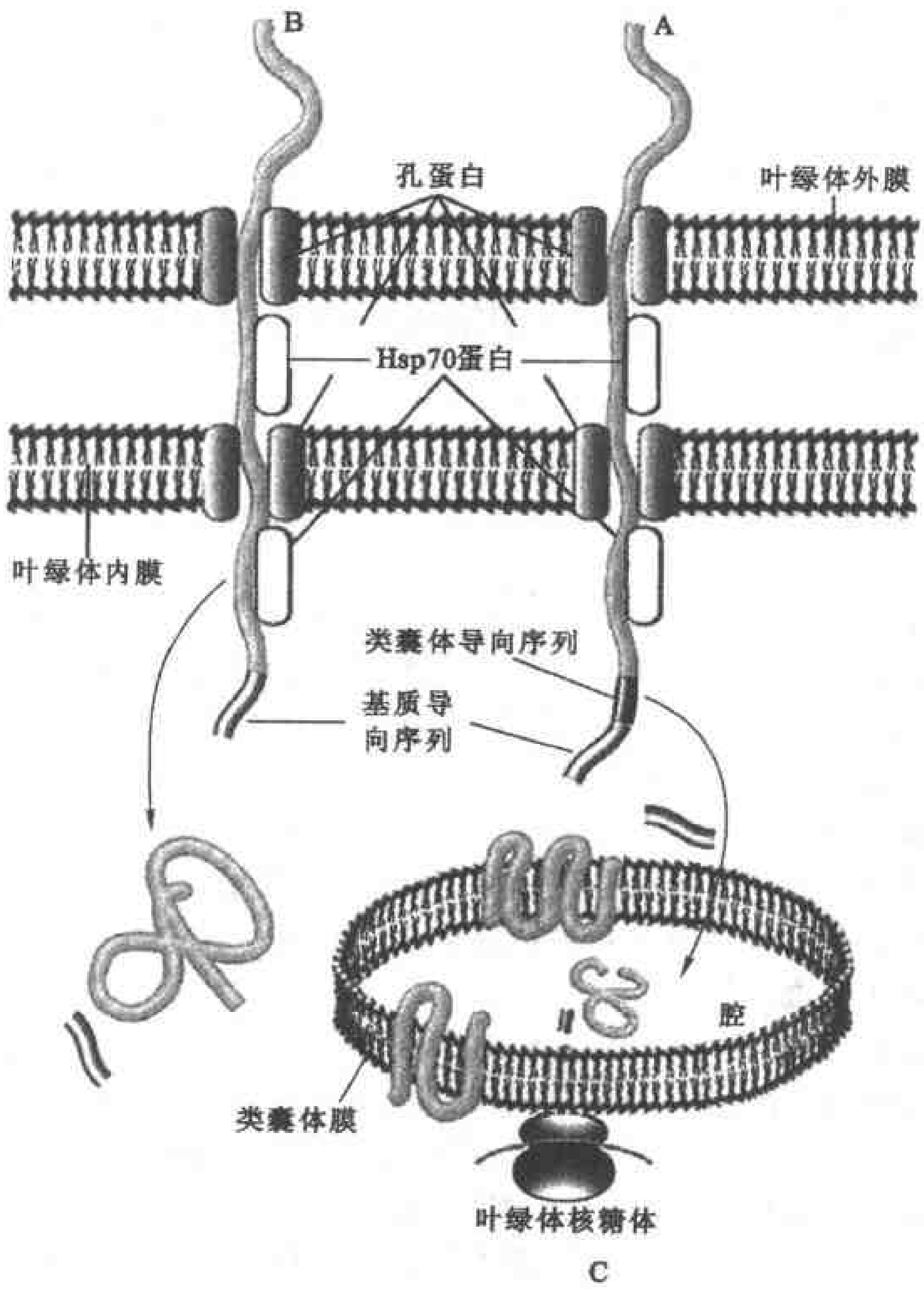


图 7－17 叶绿体蛋白跨膜转运过程图解

(引自 Gerald Karp,1999)

验表明，捕光色素蛋白整合到类囊体膜上至少需要 ATP 和基质中的可溶蛋白因子，才能与叶绿素和类胡萝卜素结合组成捕光复合物。定位于类囊体中的蛋白，其前体蛋白 N 端的转运肽可分为两个区域，分别引导两步转运，其 N 端含有导向基质的序列，引导其穿过叶绿体膜上由孔蛋白形成的通道进入基质；而 C 端含有导向类囊体的序列又引导其穿过类囊体膜，进入类囊体腔，因此，它的转运肽经历两次水解，一次在基质内，另一次在类囊体腔中(图 7-17A)；定位于基质中的蛋白，其前体蛋白 N 端的转运肽仅具有导向基质的序列，引导其穿过叶绿体膜进入基质，由基质中特异的蛋白水解酶切去转运肽成为成熟蛋白质(图 7-17B)；由叶绿体基因编码并在类囊体核糖体上合成的一些蛋白质，则结合于类囊体膜上(图 7-17C)。最后，许多运入的蛋白质与叶绿体自身合成的蛋白质共同组成复合物，发挥各自的功能。

蛋白质跨膜运送的研究是当前十分活跃的一个领域，尤其对导肽的研究更是方兴未艾。因为，这不仅在理论上具有十分重要的意义，而且在实际应用方面也有很大的潜力。显然，导肽的深入研究将有可能为“生物导弹”提供新的、更理想的“弹头”或载体。此外，导肽将有可能有目的地把一些蛋白质输入线粒体或叶绿体，有力促进细胞器工程的发展。

第四节 线粒体和叶绿体的增殖与起源

一、线粒体和叶绿体的增殖

许多研究结果和电镜观察表明，细胞内线粒体的增殖是由原来的线粒体分裂或出芽而来。在细胞发育过程中，线粒体也随之生长，膜表面积增加，基质蛋白质增多，以及线粒体 DNA 进行复制，然后线粒体再分裂。通过电镜观察，线粒体的分裂约有以下几种方式：

间壁或隔膜分离：线粒体分裂时，先由内膜向中心内褶，或是线粒体的某一个嵴延伸到对缘的内膜而形成贯通嵴，把线粒体一分为二，使之成为只有外膜相连的两个独立的细胞器，接着线粒体完全分离。这种分裂方式常出现在鼠肝和植物分生组织中。

收缩分离：分裂时线粒体中部缢缩并向两端拉长，整个线粒体约呈哑铃形，最后分开成为两个线粒体。这种分裂方式常见于蕨类和酵母中。

出芽：一般是先从线粒体上出现球形小芽，然后与母体分离，不断长大而形成新的线粒体。这种分裂方式见于酵母和藓类植物中。

D.luck(1965)以链孢霉胆碱缺陷型突变体为材料，将它们培养在含有^3H胆碱(膜磷脂的前身物)的培养基中，使线粒体膜中的脂质被同位素标记，然后再将其转移到没有同位素标记物的培养基中，结果发现在以后生长的几代线粒体中都有放射性标记。因此证实了线粒体确实是从原先存在于细胞内的线粒体分裂

而来，这一结果与电镜下直接观察到的现象相符。

在个体发育中，叶绿体是由前质体(proplastid)分化而来。前质体存在于根和芽的分生组织细胞中，是为双层膜所包被的卵圆形或球形小体，其内部为均匀的基质，无片层结构，但含有DNA、核糖体和淀粉或其他糖类。在未发育的前质体中，内膜内折形成小管状的类囊体原基，前质体的进一步发育主要与光照条件有关。在光照条件下，由内膜内折形成的小泡或小管连结成链状，继而与内膜断开，在基质中逐渐生长、融合与重排，形成扁平的小囊即基质类囊体。有的部位扁囊叠置成多层，组成了基粒。在类囊体发育的同时，也合成了光合色素，前质体即发育成叶绿体。在黑暗条件下，前质体形成的小泡转变成小管状，小管相互之间规则连接构成三维晶格结构，称为前片层体(prolamellar body)。具有这种结构的质体称为白色体或黄化质体(etiopost)，当白色体重新受到光照后，前片层体弥散，发育而形成具有正常结构和功能的叶绿体。

电镜观察表明，叶绿体是通过分裂而增殖。通常是在叶绿体的近中部处向内收缩，最后分开成为两个子叶绿体。叶绿体数目的增多主要靠幼龄叶绿体的分裂，成熟叶绿体通常不再分裂，前质体不能进行分裂。叶绿体的分裂一般并不需要光，但光对叶绿体的发育是重要的。湿度、植物激素、无机营养及水分逆境等均对叶绿体的发育和增殖有重要的影响。

二、线粒体和叶绿体的起源

关子线粒体和叶绿体的起源，现在主要存在两种截然相反的观点：内共生起源学说与非共生起源学说(或分化学说)。两个学说各有其实验证据和支持者。近10多年由于古细菌的发现与研究，以及古细菌可能是真核细胞起源的祖先的论断，十分有利于线粒体和叶绿体内共生起源学说的巩固与发展。

(一) 内共生起源学说

许多科学家认为，线粒体和叶绿体分别起源于原始真核细胞内共生的细菌和蓝藻。早在1905年，Mereschkowsky提出叶绿体起源于细胞内共生的蓝藻；1918年Porteir和1922年Wallin明确提出线粒体来自细胞内共生的细菌，即叶绿体和线粒体都是内共生体。目前内共生起源学说所积累的资料比较丰富。1970年Margulis在分析了大量资料的基础上提出了一种设想，认为真核细胞的祖先是一种体积巨大的、不需氧的、具有吞噬能力的细胞，能将吞噬所得的糖类进行酵解取得能量。而线粒体的祖先——原线粒体则是一种革兰氏阴性菌，含有进行三羧酸循环所需的酶系和电子传递链，故它可利用氧气把糖酵解的产物丙酮酸进一步分解，获得比酵解更多的能量。当这种细菌被原始真核细胞吞噬后，即与宿主细胞间形成互利的共生关系，原始真核细胞利用这种细菌(原线粒体)充分供给能量，而原线粒体从宿主细胞获得更多的原料。与此类似，叶绿体的祖先是原核生物的蓝细菌(cyanobacteria)，即蓝藻，它被原始真核细胞摄入胞内，在共生关系中，蓝藻为宿主细胞完成光合作用，而宿主细胞为其提供营养条

件。在漫长的进化过程中，这种细菌和蓝藻逐渐失去了原有的一些特征，关闭、丢失或向核内转移了一些基因，它们分别逐渐演化为现在细胞内的线粒体和叶绿体。至今线粒体和叶绿体还保留有它们祖先的一些基本特征和痕迹。关于线粒体和叶绿体内共生起源学说的主要论据归纳如下：

1. 线粒体和叶绿体的基因组在大小、形态和结构方面与细菌的相似，都是由单个裸露的环状双链 DNA 分子构成，不含有 5 - 甲基胞嘧啶，而且不与组蛋白结合，能进行独立的复制和转录。而真核细胞的基因组是由几个或更多的线性 DNA 分子与组蛋白结合形成染色体。线粒体和叶绿体的 DNA 与细胞核内的 DNA 在相对分子质量、碱基比例和核苷酸序列等方面均不一样，而与原核生物的极为相似。有证据表明，线粒体和叶绿体具有自身的 DNA 聚合酶及 RNA 聚合酶，能独立复制和转录自己特有的 RNA，其 mRNA、rRNA 的沉降系数均与细菌的类似。

2. 线粒体和叶绿体有自己完整的蛋白质合成系统，能独立合成蛋白质。蛋白质合成机制有很多类似细菌之处，而不同于真核生物。如线粒体和叶绿体中蛋白质的合成是从 N - 甲酰甲硫氨酸开始，这个特征与细菌的相似，而真核生物中蛋白质的合成是从甲硫氨酸开始。线粒体和叶绿体在核糖体大小上均较真核生物 80S 的为小，动物细胞的线粒体核糖体为 50～60S，真菌的线粒体核糖体为 70～74S，叶绿体的核糖体为 70S。在结构上，线粒体、叶绿体和原核生物（如细菌）的核糖体中只有 5SrRNA，没有 5.8SrRNA，而不少真核细胞的核糖体中存在 5.8SrRNA。线粒体中蛋白质合成因子对线粒体核糖体有特异性，它不能识别细胞质核糖体，但线粒体蛋白质合成所需要的部分蛋白质因子却可用细菌蛋白质合成系统中的蛋白质因子取代。线粒体核糖体与其 mRNA 形成多聚核糖体。叶绿体 tRNA 和氨酰 - tRNA 合成酶不能与细胞质相应的酶交叉识别，但一般能与细菌相应的酶交叉识别，用叶绿体小亚基与大肠杆菌（*E. coli*）大亚基进行组合，可以形成一个有功能的杂交核糖体。线粒体和叶绿体的核糖体合成蛋白质的作用能被氯霉素、四环素所抑制，但抑制真核生物细胞质核糖体蛋白质合成的放线酮对它们却无抑制作用。线粒体 RNA 聚合酶可被原核细胞 RNA 聚合酶的抑制剂（如利福霉素）所抑制，但不被真核细胞 RNA 聚合酶的抑制剂（如放线菌素 D）所抑制。所有这些都表明，线粒体和叶绿体的蛋白质合成系统更类似于原核细胞。

3. 线粒体和叶绿体的两层被膜有不同的进化来源，外膜与内膜的结构和成分差异很大。外膜与细胞的内膜系统相似，可与内质网和高尔基体膜沟通；内膜与细菌质膜相似，内膜内折，分别形成细菌的间体、线粒体的嵴和叶绿体的类囊体，它们的电子传递体均表现出与膜结合在一起的特点；存在于线粒体或叶绿体和基质中特有的有氧呼吸（或光合作用）的酶系，也发现存在于细菌质膜和液泡中。在膜的化学成分上，内膜的蛋白质与脂质的比值远大于外膜，因此内膜更接近细菌质膜的成分。给离体线粒体标记放射性氨基酸，只有内膜被标记，说明其内膜的蛋白质成分一部分是自己合成的。

4. 线粒体和叶绿体能以分裂的方式进行繁殖。这与细菌的繁殖方式相同。

5. 线粒体和叶绿体能在异源细胞内长期生存。把鸡胚细胞的线粒体引入小鼠体外培养的成纤维细胞，30 min 后可观察到鸡的线粒体进入小鼠细胞，在小鼠的第 4 代细胞中仍可见到鸡的线粒体。叶绿体在特殊软体动物细胞中能自然长期生存。这些都说明线粒体和叶绿体的自主性与共生性的特征。

6. 线粒体的祖先很可能来自反硝化副球菌或紫色非硫光合细菌。其主要依据是这两种菌的磷脂成分、呼吸类型和细胞色素 c 的初级结构与线粒体的更为接近。

7. 发现介于胞内共生蓝藻与叶绿体之间的结构——蓝小体，其特征在很多方面可作为原始蓝藻向叶绿体演化的佐证。

近年来分子进化研究的成果提供了大量的事实证实并丰富了内共生起源学说，得到许多学者的支持，但也有一些人表示怀疑和反对。如从进化角度，如何解释在代谢上明显占优势的共生体反而将大量的遗传信息转移到宿主细胞中？特别是不能解释细胞核是如何进化来的，即原核细胞如何演化为真核细胞。这个学说还遇到一个新问题，即线粒体和叶绿体的基因组中存在内含子，而真细菌原核生物基因组中不存在内含子，如果同意内共生起源学说的观点，那么线粒体和叶绿体基因组中的内含子从何而来？

综上所述，线粒体和叶绿体在细胞内表现出较多的自主性与独立性，很多基本特点与细菌细胞较为相似，这决不是一种巧合，而更多的是起源上的关系。

（二）非共生起源学说

该学说的支持者提出一种线粒体和叶绿体起源的设想，认为真核细胞的前身是一个进化上比较高等的好氧细菌，它比典型的原核细胞大，这样就要逐渐增加具有呼吸功能的膜表面，开始是通过细菌细胞膜的内陷、扩张和分化，后逐渐形成了线粒体和叶绿体的雏形。根据 1974 年 Uzzell 等人的观点，在进化的最初阶段，原核细胞的基因组进行复制并不伴有细胞分裂，然后基因组附近的质膜内陷形成双层膜，分别将基因组包围在这些双层膜的结构中，从而形成了原始的线粒体、叶绿体和细胞核等细胞器。后来在进化过程中进一步发生了分化，如线粒体和叶绿体的基因组丢失一些基因；细胞核的基因组则有了高度发展；质体发展了光合作用功能；线粒体则演变为专具呼吸功能的细胞器，于是逐渐形成了现在的真核细胞。

这一学说解释了真核细胞核被膜的形成与演化的渐进过程，这也正是内共生学说所不能解释的问题。而且，质膜内陷、基因组扩大与丢失，在细胞中是完全可能发生的。因此，这一学说得到了一些学者的支持。但是，这一学说的实验证据不多，同时也无法解释为何线粒体、叶绿体与细菌在 DNA 分子结构和蛋白质合成性能上有那么多相似之处。对线粒体和叶绿体的 DNA 酶、RNA 酶和核糖体的来源也很难解释。真核细胞的细胞核能否起源于细菌的核区？矛盾之多，差异之大，均难以解释。

总之，从目前看，对这两个学说尚有争议，各有其实验证据和支持者，因此，

关于线粒体和叶绿体的起源，有待今后进一步探讨和研究。

提　要

线粒体和叶绿体是真核细胞两种重要的产能细胞器，它们能高效地将能量转换成细胞进行各种生命活动的直接能源——ATP。线粒体广泛存在于各类真核细胞中，而叶绿体仅存在于植物细胞中。

线粒体和叶绿体是细胞内较大的细胞器，在光学显微镜下即可看见。它们的形状、大小、数目和分布常因细胞种类、生理功能及生理状况不同而有较大差别。它们的形态结构特征主要是具有封闭的两层单位膜，内膜向内折叠，并演化为极大扩增的内膜特化结构系统——线粒体的嵴和叶绿体的类囊体，构成多酶体系行使功能的结构框架，从而使氧化磷酸化和光合作用等复杂的化学反应能有条不紊地顺利进行。

线粒体和叶绿体的化学成分主要是蛋白质和脂质。在它们的基质中含有许多酶、核糖体、DNA、RNA及无机离子等。

线粒体的主要功能是进行氧化磷酸化。氧化磷酸化是在内膜上进行的一个形成ATP的过程。它是在电子从NADH或$FADH_2$经过电子传递链传递给氧的过程中发生的。每一NADH被氧化产生3个ATP分子，而每一$FADH_2$被氧化产生2个ATP分子，电子最终被O_2接收而生成H_2O。

叶绿体的主要功能是进行光合作用。其过程可分为3大步骤：① 原初反应；② 电子传递和光合磷酸化；③ 碳同化。前2步属于光反应，它是在类囊体膜上进行的，是由光引起的光化学反应，其产物是ATP和NADPH；碳同化属于暗反应，是在叶绿体的基质中进行的不需光的酶促化学反应，即利用光反应产生的ATP和NADPH的化学能，使CO_2还原合成糖。光合作用的电子传递是在光系统Ⅰ和光系统Ⅱ中进行的，这两个光系统互相配合，利用所吸收的光能把1对电子从H_2O传递给$NADP^+$。按照电子传递的方式可将光合磷酸化分为非循环式和循环式两种类型。

化学渗透假说认为，电子在电子传递链传递过程中所释放的能量转换成了跨越内膜的H^+浓度的势能，这种势能驱动氧化磷酸化和光合磷酸化反应，合成ATP。

线粒体和叶绿体都是半自主性细胞器。在基质中含有环状DNA和蛋白质合成的全套机构，但其自身合成蛋白质的种类十分有限，构成线粒体和叶绿体的绝大多数蛋白质都是由核DNA编码在细胞质核糖体上合成。

线粒体和叶绿体的增殖主要是通过分裂进行的。线粒体和叶绿体的起源主要有两种不同的观点，即内共生起源学说和非共生起源学说。前者认为线粒体和叶绿体分别起源于原始真核细胞内共生的细菌和蓝藻，它们与宿主细胞间形成互利的共生关系，在长期的进化过程中，分别演化为线粒体和叶绿体。后者认为，真核细胞的前身是一种好氧细菌，这种细菌通过质膜内陷、扩张形成的双层

膜分别将基因组包围在其中，后来在进化过程中发生了分化，从而逐渐形成了线粒体、叶绿体和细胞核等细胞器。

线粒体和叶绿体在进化、结构与功能上都有很多相似之处。呼吸作用和光合作用的能量转换有许多共同点。在机制研究上很多地方可以互相借鉴，这对于探讨生物中能量转换的规律是十分重要的。

思考题

1. 为什么说线粒体和叶绿体是细胞内的两种产能细胞器？
2. 试比较线粒体与叶绿体在基本结构方面的异同。
3. 如何测定线粒体的呼吸链各组分在内膜上的排列分布？
4. RuBP 羧化酶有何功能？它是由哪些亚基组成的？各由何基因组编码？
5. 试比较线粒体的氧化磷酸化与叶绿体的光合磷酸化的异同点。
6. 如何证明线粒体的电子传递和磷酸化作用是由两个不同的结构系统来实现的？
7. 光系统、捕光复合物和作用中心的结构与功能的关系如何？
8. 氧化磷酸化偶联机制的化学渗透假说的主要论点是什么？有哪些证据？
9. 由核基因组编码、在细胞质核糖体上合成的蛋白质是如何运送至线粒体和叶绿体的功能部位上进行更新或装配的？
10. 试比较光合碳同化三条途径的主要异同点。
11. 为什么说线粒体和叶绿体是半自主性细胞器？
12. 简述线粒体与叶绿体的内共生起源学说和非共生起源学说的主要论点及其实验证据。

参考文献

1. 翟中和主编．细胞生物学．北京：高等教育出版社，1995，149～171，379～383

2. 李宝健主编．面向 21 世纪生命科学发展前沿．广州：广东科技出版社，1996．56～61，93～111

3. 朱玉贤，李毅．现代分子生物学．台北：艺轩图书出版社，1998，312～332，428～435

4. 周云龙主编．植物生物学．北京：高等教育出版社，1999，179～212

5. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: concepts and experiments, 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999

6. Alberts B *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland publishing Inc., 1998, 407～445

7. Alberts B *et al*. Molecuar Biology of the Cell. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing Inc., 1994, 653～720

8. Albert L Lehninger *et al*. Principles of Biochemistry. 2nd ed. New York: Worth Publishers Inc., 1993, 542～592

9. Darnell J *et al*. Molecular Cell Biology. New York: Scientific American Books, 1995, 739～777, 809～836

10. Frank B Salisbury, Cleon W Ross. Plant physiology. 4th ed. California: Wadsworth Pub-

lishing Company Belmont,California A Division of Wadsworth Inc., 1991,207～224

11. Matti Saraste. Oxidative Phosphorylation at the fin de siecle. Science,1999,283:1488～1493

12. Fillingame RH. J Exp Biol.,1997,200:217～224

13. Shu sen Liu. Cooperation of a "Reactive Oxygen Cycle" with the Q Cycle and the Proton Cycle in the Respiratory Chain(Superoxide Generating and Cycling Mechanisms in Mitochondria. Journal of Bioenergetics and Biomembranes,1999,Vol.31,No.4,367～376

14. D Sabbert *et al*. Intersubunit rotation in actie F－ATPase. Nature,1994, Vol. 381,623～625

第八章

细胞核与染色体

细胞核是真核细胞内最大、最重要的细胞器，是细胞遗传与代谢的调控中心。自 1831 年 R.Brown 首次命名细胞核(nucleus)以来，对于细胞核的研究始终倍受重视。

所有真核细胞，除高等植物韧皮部成熟的筛管和哺乳动物成熟的红细胞等极少数例外，都含有细胞核。一般说来，真核细胞失去细胞核后不久即导致细胞的死亡。细胞核大多呈球形或卵圆形，但也随物种和细胞类型不同而有很大变化。细胞核与细胞质在体积之间通常存在一个大致的比例，即细胞核的体积约占细胞总体积的 10％左右，这被认为是制约细胞最大体积的主要因素之一。核的大小依物种不同而变化，高等动物细胞核直径一般为 5～10μm，高等植物细胞核直径一般为 5～20μm，低等植物细胞核直径约 1～4μm。

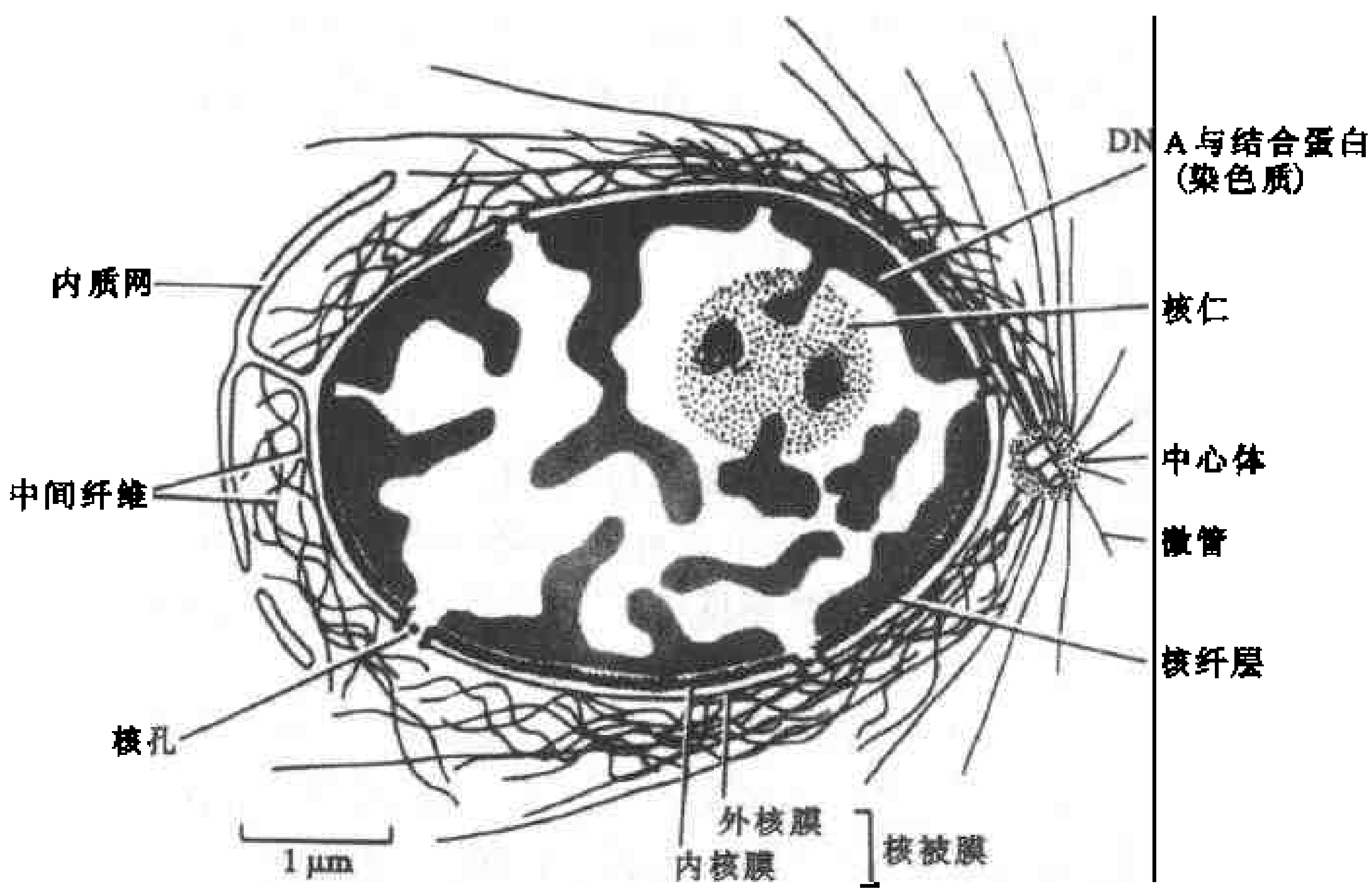


图 8－1　典型的细胞核结构示意图(引自 B.Alberts)

细胞核主要由核被膜、染色质、核仁及核骨架组成(图 8-1)。细胞核是遗传信息的贮存场所,在这里进行基因复制、转录和转录初产物的加工过程,从而控制细胞的遗传与代谢活动。

第一节 核被膜与核孔复合体

核被膜(nuclear envelope)位于间期细胞核的最外层,是细胞核与细胞质之间的界膜。由于它的特殊位置决定了它有两方面的功能,一方面核被膜构成了核、质之间的天然选择性屏障,它将细胞分成核与质两大结构与功能区域:DNA复制、RNA转录与加工在核内进行,蛋白质翻译则局限在细胞质中。这样就避免了彼此相互干扰,使细胞的生命活动更加秩序井然;同时核被膜还能保护核内的DNA分子免受由于细胞骨架运动所产生的机械力的损伤。另一方面,核被膜并不是完全封闭的,核质之间有频繁的物质交换与信息交流,这主要是通过核被膜上的核孔复合体进行的。

核被膜在普通光学显微镜下难以分辨,在相差显微镜下,由于细胞核与细胞质的折光率不同,可以看出核被膜的界限,只有在电子显微镜下才能看清核被膜的细微结构。关于核被膜的结构组成,目前有两种看法,一种意见认为核被膜有三种结构组分,即双层核膜、核孔复合体与核纤层(图 8-1)。核纤层(nuclear lamina)紧贴内层核膜下,是一层由纤维蛋白构成的网络结构,它与胞质中间纤维、核内骨架有密切联系。当真核细胞用非离子去垢剂、核酸酶及高盐溶液等分级抽提后,核纤层往往与核孔复合体、胞质中间纤维、核内骨架一起被保存下来,成为贯穿于细胞核与细胞质的骨架结构体系;由此又有人认为核纤层不应该属于核被膜的一种结构组分。在这里我们把核纤层放在细胞骨架结构系统中介绍,本节着重介绍核被膜与核孔复合体。

一、核被膜

(一) 结构组成

核被膜由内外两层平行但不连续的单位膜构成。面向核质的一层膜被称作内(层)核膜(inner nuclear membrane),而面向胞质的另一层膜称为外(层)核膜(outer nuclear membrane)。两层膜厚度相同,均为7.5 nm。两层膜之间有20~40 nm的透明空隙,称为核周间隙(perinuclear space)或核周池(perinuclear cisternae),其宽度随细胞种类不同而异,并随细胞的功能状态而改变。内、外核膜各有特点:① 外核膜表面常附有核糖体颗粒,且常常与糙面内质网相通连,使核周间隙与内质网腔彼此相通。从这种结构上的联系出发,外核膜可以看作是糙面内质网的一个特化区域。② 内核膜表面光滑,无核糖体颗粒附着,但紧贴其内表面有一层致密的纤维网络结构,即核纤层。内核膜上有一些特有的蛋白成分,如核纤层蛋白B受体(lamin B receptor,LBR)。

双层核膜互相平行但并不连续，内、外核膜常常在某些部位相互融合形成环状开口，称为核孔（nuclear pore）。在核孔上镶嵌着一种复杂的结构，叫做核孔复合体。核孔周围的核膜特称为孔膜区（pore membrane domain），它也有一些特有的蛋白成分，如核孔复合体特有的跨膜糖蛋白 gp210、Pom121 等。

（二）核被膜在细胞周期中的崩解与装配

在真核细胞的细胞周期中，核被膜有规律地解体与重建。在分裂期，双层核膜崩解成单层膜泡，核孔复合体解体，核纤层去装配；到分裂末期，核被膜开始围绕染色体重新形成。那么，子细胞的核被膜是来源于旧核被膜碎片？还是来自其他膜结构？对此一直有两种意见。通过对变形虫的研究，很多人支持第一种说法，即新核膜来自旧核膜。将变形虫培养在含有 ^3H－胆碱的培养基中，^3H－胆碱掺人到膜脂的磷脂酰胆碱中，这样核膜便被 ^3H 标记。将带有放射性标记的核取出，移植到正常的去核变形虫中，追踪观察一个细胞周期，结果发现子代细胞形成后，原有的放射性标记全部平均分配到子细胞的核被膜中，说明旧核膜参与了新核膜的构建。

对于核膜装配的机制及其与核孔复合体、核纤层的关系，目前尚无定论。一种以非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）卵提取物为基础的非细胞核装配体系（cell-free nuclear assembly system）为研究该问题提供了很好的实验模型。非洲爪蟾的卵母细胞成熟后处于第二次减数分裂中期，此时的卵母细胞体积很大，直径可达 1 mm，其中储存了大量的营养物质，为受精后快速卵裂做准备，一个成熟的卵母细胞所储备的原料可供形成 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞核。现已设法将这种卵提取物在体外（*in vitro*）成功地模拟出细胞核的构建及解体过程。目前越来越多的证据表明，一种直径 200 nm 左右的单层小膜泡直接参与了核膜的形成。它们首先附着到染色质表面，在染色质表面排列并相互融合形成双层膜，同时在膜上的某些部位内、外膜相互融合并形成核孔复合体结构。对 HeLa 细胞的有丝分裂过程进行研究发现，核被膜在细胞周期中发生有序的去装配与重装配。从处于分裂期的 HeLa 细胞中可以分离出两种膜泡组分：一组富含 LBR，另一组富含 gp210。这说明核被膜的去装配不是随机的，而是具有区域特异性（domain-specific）。在有丝分裂后期核被膜重新装配时，富含 LBR 的膜泡首先与染色质结合，而富含 gp210 的膜泡与染色质结合较晚。此外，核被膜的去装配、重装配变化受细胞周期调控因子的调节，这种调节作用可能通过对核纤层蛋白、核孔复合体蛋白等进行磷酸化与去磷酸化修饰来实现。

二、核孔复合体

1949—1950 年间，H.G.Callan 与 S.G.Tomlin 在用透射电子显微镜观察两栖类卵母细胞的核被膜时发现了核孔，随后人们逐渐认识到核孔并不是一个简单的孔洞，而是一个相对独立的复杂结构。1959 年 M.L.Watson 将这种结构命名为核孔复合体（nuclear pore complex，NPC）。迄今已知所有的真核细胞，从酵

母到人，其间期细胞核普遍存在核孔复合体。核孔复合体在核被膜上的数量、分布密度与分布形式随细胞类型、细胞核的功能状态而有很大的差异。一般来说，转录功能活跃的细胞，其核孔复合体数量较多。一个典型的哺乳动物细胞核被膜上的核孔复合体总数约 3 000～4 000 个，相当于 10～60 个/μm^2。

（一）结构模型

核孔复合体镶嵌在内外核膜融合形成的核孔上，核孔的直径约为 80～120 nm，而核孔复合体稍大一些，直径为 120～150 nm，因为它有一部分结构嵌入核被膜内。有关核孔复合体的结构一直是一个令人感兴趣的问题，自被发现以来，不断有新的结构模型提出，但至今并不完善，仍有一些关键性的问题有待阐明。这主要是因为分离纯化核孔复合体的方法还不够完善，并且还受到电镜制样技术与观察方法的限制。研究核孔复合体形态结构的经典方法主要有三种：树脂包埋超薄切片技术、负染色技术与冷冻蚀刻技术（图 8－2）。20 世纪 80 年代以来，计算机图像处理技术应用于电镜的图像分析，高分辨率场发射扫描电镜技术（HR－FESEM）的发展，以及快速冷冻－冷冻干燥制样技术的发展，使人们对核孔复合体的形态结构有了更深入的了解。综合已有的资料人们提出了一个最新的核孔复合体结构模型（图 8－3）。

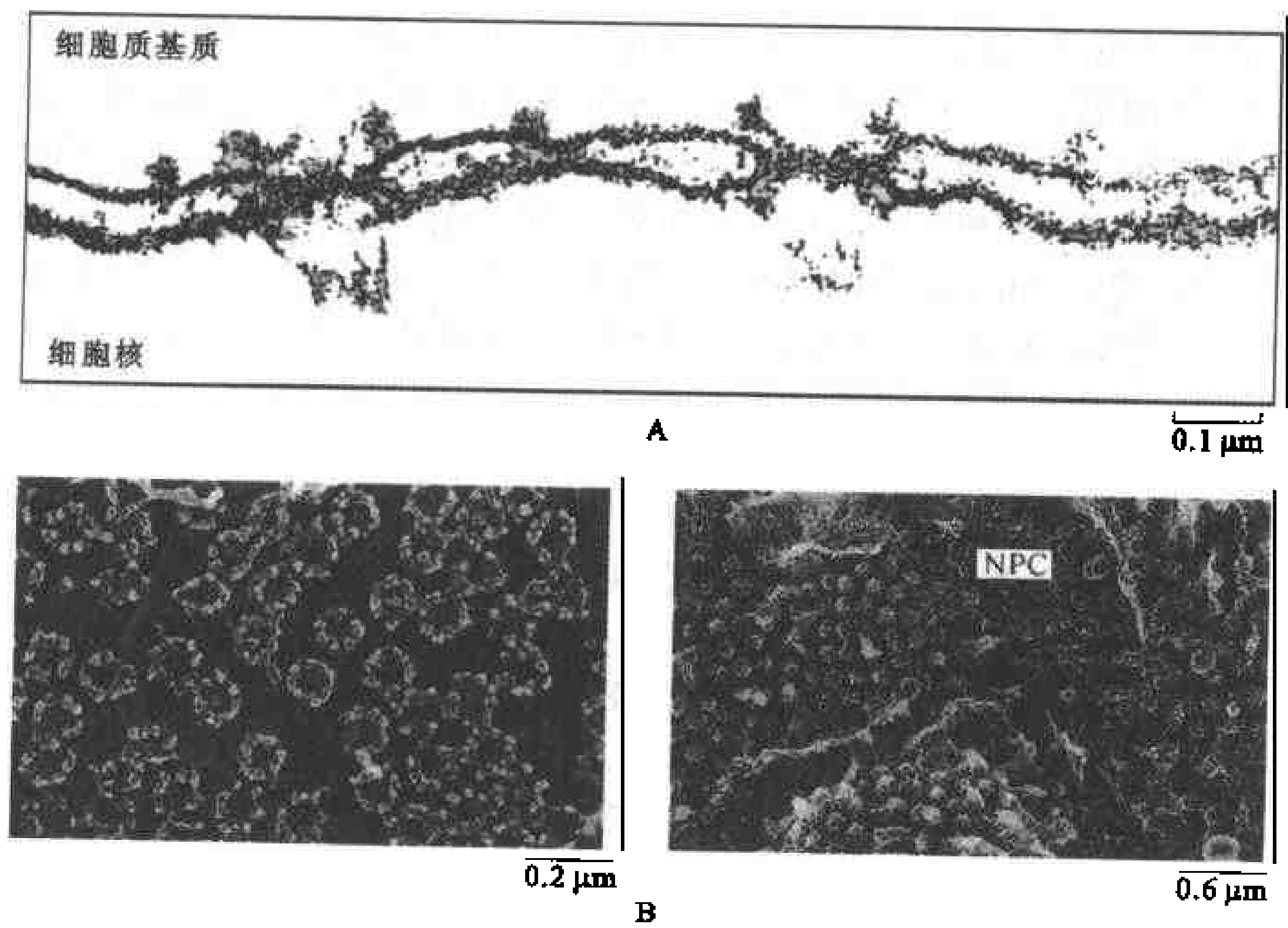


图 8－2　用电镜超薄切片技术（A）和冷冻蚀刻技术（B）显示的核孔复合体（NPC）

对于这个模型的结构组成目前有两种理解：① 从横向上看，核孔复合体由周边向核孔中心依次可分为环、辐、栓三种结构亚单位；② 从纵向上看，核孔复

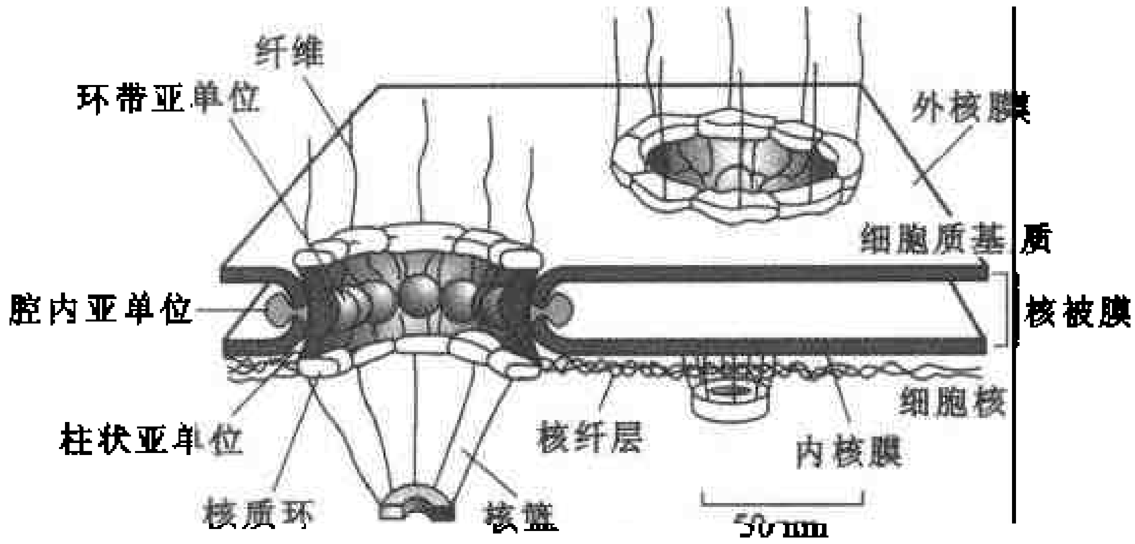


图 8-3　核孔复合体结构模型(引自 B. Alberts)

合体由核外(胞质面)向核内(核质面)依次可分为胞质环、辐(+栓)、核质环三种结构亚单位,形成"三明治"(sandwich)式的结构。综合起来,核孔复合体主要有以下 4 种结构组分:ⓐ 胞质环(cytoplasmic ring):位于核孔边缘的胞质面一侧,又称外环,环上有 8 条短纤维对称分布伸向胞质;ⓑ 核质环(nuclear ring):位于核孔边缘的核质面一侧,又称内环,内环比外环结构复杂,环上也对称地连有 8 条细长的纤维,向核内伸入 50~70 nm,在纤维的末端形成一个直径为 60 nm 的小环,小环由 8 个颗粒构成。这样整个核质环就像一个"捕鱼笼"(fish-trap)样的结构,也有人称为核篮(nuclear basket)结构;ⓒ 辐(spoke):由核孔边缘伸向中心,呈辐射状八重对称。它的结构也比较复杂,可进一步分为三个结构域:主要的区域位于核孔边缘,连接内、外环,起支撑作用,称作"柱状亚单位"(column subunit)。在这个结构域之外,接触核膜部分的区域称为"腔内亚单位"(luminal subunit),它穿过核膜伸入双层核膜的膜间腔。在"柱状亚单位"之内,靠近核孔复合体中心的部分称作"环带亚单位"(annular subunit),由 8 个颗粒状结构环绕形成核孔复合体核质交换的通道;ⓓ 栓:或称中央栓(central plug),位于核孔的中心,呈颗粒状或棒状,所以又称为中央颗粒(central granule);由于推测它在核质交换中起一定的作用,所以还把它叫做"transporter"。不过不是在所有的核孔复合体中都能观察到这种结构,因此有人认为它不是核孔复合体的结构组分,而只是正在通过核孔复合体的被转运的物质。由上述结构模型可见,核孔复合体对于垂直于核膜通过核孔中心的轴呈辐射状八重对称结构,而相对于平行于核膜的平面则是不对称的,即核孔复合体在核质面与胞质面两侧的结构明显不对称,这与其在功能上的不对称性是一致的。

最近,对于"fish-trap"结构又有新的发现。H.Ris 与 M.Malecki 运用高分辨率场发射扫描电镜(HR-FESEM)观察非洲爪蟾卵母细胞核膜上的核孔复合体,发现"fish-trap"并非中断并游离在核质中,而是与一种称为"cable"的网络通道相连通。这种 cable 由与"fish-trap"类似的结构单位串联而成,看上去像是"fish-trap"上的纤维与小环在核质中的周期性重复与延续。从"fish-trap"末端小环的 8 个颗粒上又发出 8 条细长的纤维,在纤维上周期性地间隔有 8 个颗粒构

成的环状结构。不同的"fish-trap"发出的 cable 相互交叉,使 cable 成为一个遍布核质、相互贯通的复杂的网络。这种与"fish-trap"相连、相似的 cable 有何功能尚不清楚,推测它很可能与核孔复合体的核质转运功能有关。

(二) 核孔复合体成分的研究

核孔复合体主要由蛋白质构成,其总相对分子质量约为 $125\ 000 \times 10^3$,推测可能含有 100 余种不同的多肽,共 1 000 多个蛋白质分子。最近两年,分离鉴定核孔复合体蛋白成分的工作进展很快,特别是生化与遗传学技术相结合,在酵母中已鉴定出 30 余种与核孔复合体相关的蛋白成分。迄今已鉴定的脊椎动物的核孔复合体蛋白成分也已达到十多种(表 8-1),其中 gp210 与 p62 是最具有代表性的两个成分,它们分别代表着核孔复合体蛋白的两种类型。实际上,这两类蛋白成分在从酵母到人的多种生物中都已被发现证实,它们在不同的物种中有很强的同源性;核孔复合体的整个结构在进化上是高度保守的。目前人们倾向于把所有的核孔复合体蛋白统一命名为"核孔蛋白"(nucleoporin,Nup)。

表 8-1 已知的脊椎动物核孔复合体的蛋白成分简表

蛋白名称	对应的 NPC 结构	功能与特性
gp210	孔膜区,跨膜蛋白	能与 ConA 结合;N 端位于膜间腔,C 端将 NPC 锚定在核膜上
Pom121	孔膜区,跨膜蛋白	能与 WGA 结合;C 端有 FXFG 重复序列
Nup153	"fish-trap"	能与 WGA 结合;N 端有 FXFG 重复序列;具有锌指结构,能够结合 DNA(*in vitro*)
Nup180	胞质环及其纤维	不能与 WGA 结合;其抗体对核质交换没有抑制作用;介导 NPC 与胞质骨架的联系
Nup155	核质面与胞质面	不能与 WGA 结合
p62	中央颗粒	能与 WGA 结合;具有 FXFG 重复序列;其抗体对核质交换有抑制作用;能与 p58,p54,p45 形成 p62 复合体;与酵母的 Nsp1p 同源
p58		具有 FG 重复序列;与酵母的 Nup49p 同源
p54		具有 FG 重复序列;与酵母的 Nup57p 同源
p45		具有 FG 重复序列
Nup84(大鼠) 或 Nup88(人)		
Nup214/CAN	胞质环纤维	能与 WGA 结合
Nup107p		与酵母的 Nup84p 同源
Nup98p		具有 GLFG 重复序列;与酵母的 Nup116p 同源
Nup155		与酵母的 Nup170 同源
p260/Tpr	胞质环纤维	不能与 WGA 结合

gp210 代表一类结构性跨膜蛋白,是第一个被鉴定出来的核孔复合体蛋白,相对分子质量为 210×10^3,位于核膜的"孔膜区",故认为它在锚定核孔复合体的结构上起重要作用。其糖基化修饰位点在天冬酰胺残基上,为 *N* 连接甘露糖残基寡糖链,因而与刀豆球蛋白 A(Con A)有较强的结合作用。它在糙面内质网上新合成时,N 端带有信号肽,但并不参与核孔复合体结构的形成。目前认为

gp210 主要有三方面的功能：① 介导核孔复合体与核被膜的连接，将核孔复合体锚定在“孔膜区”，从而为核孔复合体装配提供一个起始位点；② 在内、外核膜融合形成核孔中起重要作用。gp210 氨基酸序列中有两段疏水区，其中靠近 C 端的疏水区位于孔膜区，是跨膜结构域，另一段疏水区则位于核周间隙内，推测当核孔复合体装配开始时，gp210 位于核周间隙内的肽段构象发生变化，从而使其中的疏水区暴露，使之与核膜相互作用，通过这一方式诱导内外核膜融合；③ 在核孔复合体的核质交换功能活动中起一定作用，如 gp210 核周间隙内肽段的抗体能够降低蛋白质入核转运的速度。后来又报道发现另外一种位于孔膜区的蛋白成分，命名为 Pom121。

p62 代表一类功能性的核孔复合体蛋白。它带有 O 连接 *N*－乙酰葡萄糖胺残基(O-linked GlcNac)寡糖修饰，因此与麦胚凝集素(WGA)有较强的亲和性。脊椎动物的 p62 分子主要分为两个结构域：① 疏水性 N 端区，具有 XFXFX(F：苯丙氨酸；X：任意氨基酸)形式的重复序列，由其氨基酸序列推测适合形成 β－折叠结构；糖基化修饰发生在这个区域中接近 C 端区的肽段。这个区域可能在核孔复合体功能活动中直接参与核质交换。② C 端区，具有疏水性的七肽重复序列，类似一些纤维蛋白(如中间纤维蛋白、核纤层蛋白)的杆状区，适合形成 α－螺旋。推测这个区域可能通过卷曲螺旋与其他核孔复合体蛋白成分相互作用，从而将 p62 分子稳定到核孔复合体上，为其 N 端进行核质交换活动提供支持。p62 对核孔复合体行使正常的功能非常重要。目前，这一类核孔复合体蛋白成分已有很多被鉴定出来，其中有些像 p62 一样带有 O 连接 GlcNac 类型的糖基化修饰，并且含有一些重复序列，如 Nup153 中的 FXFG(F：苯丙氨酸，X：任意氨基酸，G：甘氨酸)，Nup98 中的 GLFG(L：亮氨酸)，也有些没有任何糖基化修饰或类似的重复序列。

(三) 核孔复合体的功能：核质交换的双向选择性亲水通道

从功能上讲，核孔复合体可以看作是一种特殊的跨膜运输蛋白复合体，并且是一个双功能、双向性的亲水性核质交换通道。双功能表现在它有两种运输方式：被动扩散与主动运输。双向性表现在既介导蛋白质的入核转运，又介导 RNA、核糖核蛋白颗粒(RNP)的出核转运(图 8－4)。

1. 通过核孔复合体的被动扩散

核孔复合体作为被动扩散的亲水通道，其有效直径为 9～10 nm，有的可达 12.5 nm，即离子、小分子以及直径在 10 nm 以下的物质原则上可以自由通过。对静止期核孔的有效大小是通过将标记的非核组成成分注射到细胞质中，计算它们向核内扩散的速率来研究的。将聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone，PVP)包被的胶体金颗粒，通过显微注射引入变形虫细胞质内，然后在电镜下检查金颗粒的分布，结果发现它们是经过核孔复合体的中心进入细胞核的，估计中央通道的直径为 12.5 nm。通过核孔复合体的扩散速度与分子大小成反比，相对分子质量小于 5.0×10^3 的小分子可以自由扩散，17×10^3 的蛋白质在 2 min 内可达到核质间平衡，44×10^3 的蛋白质需 30 min 达到平衡，而大于 60×10^3 的

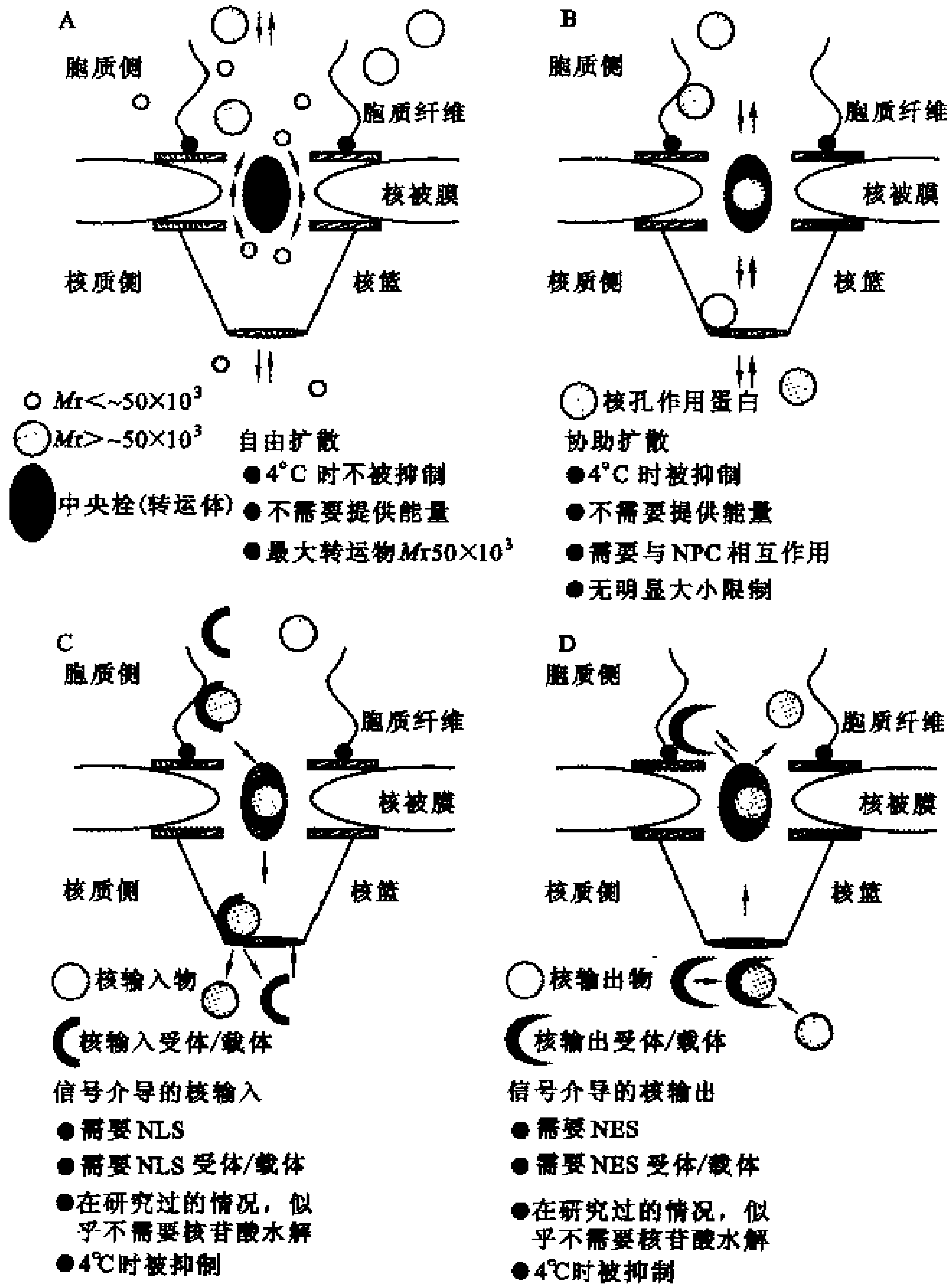


图 8－4　通过核孔复合体物质运输的功能示意图(引自 B.Talcott 等,1999)
A: 自由扩散;B: 协助扩散;C: 信号介导的核输入;D: 信号介导的核输出

球蛋白则几乎不能进入核内。根据这些定量分析资料推断,核孔复合体是一个圆形亲水通道,其功能直径为 9 nm,长约 15 nm 的通道。这与电镜照片上可以看到的通道的大小是基本一致的。对于球形蛋白质,这种有效直径相当于允许相对分子质量在 $40\times 10^3\sim 60\times 10^3$ 以下的蛋白质分子自由穿过核孔。但实际上并不是所有符合这个条件的蛋白质都可以随意出入细胞核。有许多小分子的蛋白质,如组蛋白 H1,其相对分子质量虽只有 21×10^3,但由于它本身带有具信号功能的氨基酸序列,所以是通过主动运输进入细胞核的;有的小分子蛋白质本

身虽然没有信号序列，但可以与其他有信号序列的成分结合，一起被主动运输到核内。因此，核孔复合体的这种被动扩散通道并不意味着所有 10 nm 以下的小分子在核被膜两侧就一定均匀分布。有些小分子蛋白质可能会因为与其他大分子相结合，或与一些不溶性结构成分（如中间纤维、核骨架等）结合而被限制在细胞质或细胞核内。

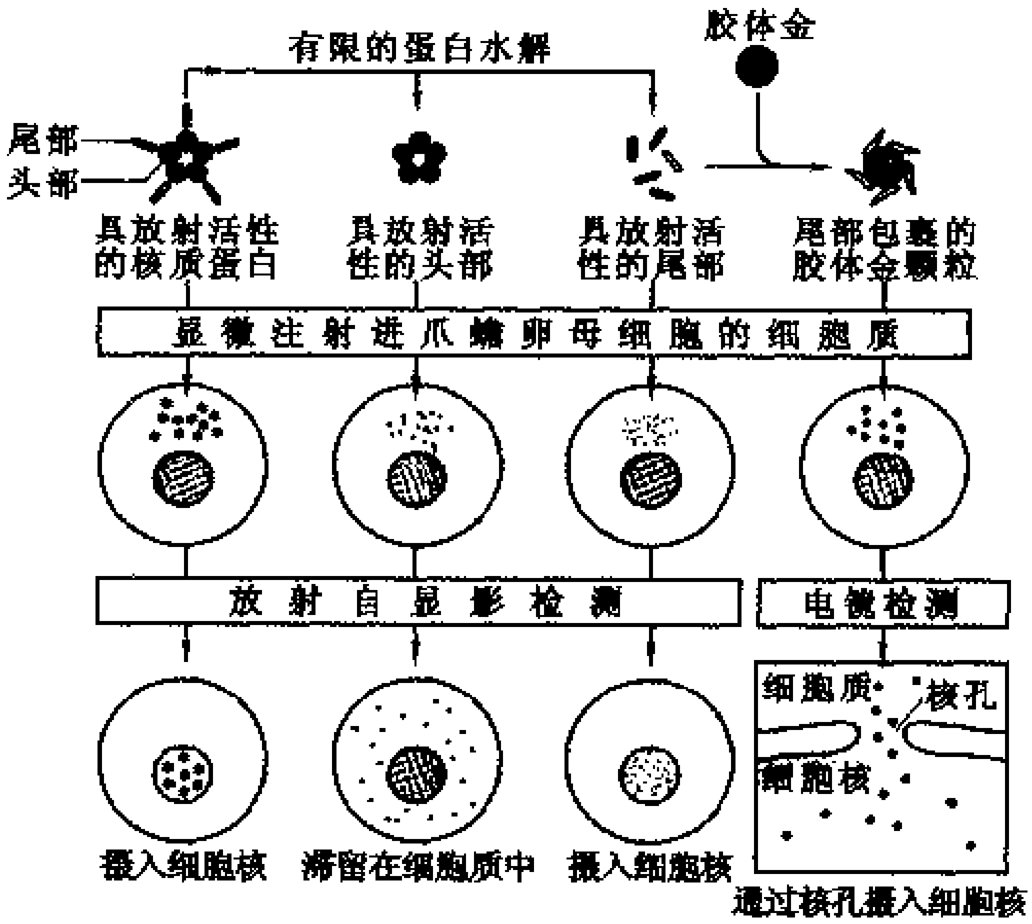


图 8－5　爪蟾卵母细胞核质蛋白注射实验（引自 B. Alberts）

2．通过核孔复合体的主动运输

生物大分子的核质分配如亲核蛋白的核输入，RNA 分子及 RNP 颗粒的核输出，在细胞核功能活性的控制中起着非常重要的作用。对于真核细胞来说，典型的哺乳类细胞的核被膜上有3 000～4 000 个核孔（约 11 个/μm^2），如果细胞正在合成 DNA，为了确保染色质包装，则需要每 3 min 从细胞质向核内输入 10^6 个组蛋白分子，这意味着每个核孔每分钟要运进 100 个组蛋白分子。如果细胞在迅速生长，则需要每个核孔每分钟从细胞核向细胞质输出三对核糖体大小亚基，以确保蛋白质合成的需要。现在已知，这种大分子的核质分配主要是通过核孔复合体的主动运输完成的，具有高度的选择性，并且是双向的。其主动运输的选择性表现在以下三个方面：① 对运输颗粒大小的限制。主动运输的功能直径比被动运输大，约 10～20 nm，甚至可达 26 nm。像核糖体亚单位那样大的 RNP 颗粒也可以通过核孔复合体从核内运输到细胞质中，表明核孔复合体的有效直径的大小是可被调节的；② 通过核孔复合体的主动运输是一个信号识别与载体介导的过程，需要消耗 ATP 能量，并表现出饱和动力学特征；③ 通过核孔复合体的主动运输具有双向性，即核输入与核输出，它既能把复制、转录、染色体构建和核糖体亚单位装配等所需要的各种因子如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、组蛋白、核糖体蛋白等运输到核内；同时又能将翻译所需的 RNA、装配好的核糖体亚

单位从核内运送到细胞质。有些蛋白质或 RNA 分子甚至两次或多次穿越核孔复合体，如核糖体蛋白、snRNA 等。

近几年对于亲核蛋白的入核转运机制的研究进展较快。亲核蛋白(karyophilic protein)是指在细胞质内合成后，需要或能够进入细胞核内发挥功能的一类蛋白质。大多数的亲核蛋白往往在一个细胞周期中一次性地被转运到核内，并一直停留在核内行使功能活动，典型的如组蛋白、核纤层蛋白等；但也有一些亲核蛋白需要穿梭于核质之间进行功能活动，如 importins。通过研究核质蛋白(nucleoplasmin)的入核转运，人们逐步发现了指导亲核蛋白入核的信号。核质蛋白，相对分子质量 165×10^3，是一个五聚体，在非洲爪蟾卵母细胞核中含量丰富。用蛋白水解酶进行有限的水解，可以分别得到头部片段(N 端)与尾部片段(C 端)。将带有放射性标记的完整核质蛋白或头、尾片段分别注射到爪蟾卵母细胞的细胞质中，结果发现，完整的核质蛋白能够在细胞核内迅速地积累，同时发现尾部片段也能被高效地转运到核内，而头部片段却被拒之核外(图 8－5)。显然有某种亲核的输入信号存在于尾部片段。如果把尾部片段包裹在直径 20 nm 的胶体金颗粒上，然后注射到细胞质中，这种金颗粒也能在核内积累；换用完整的核质蛋白包裹胶体金颗粒可以得到同样的结果。现在已经证实，亲核蛋白一般都含有特殊的氨基酸序列，这些内含的特殊短肽保证了整个蛋白质能够通过核孔复合体被转运到细胞核内。这段具有"定向"、"定位"作用的序列被命名为核定位序列或核定位信号(nuclear localization sequence 或 nuclear localization signal，NLS)。第一个被确定序列的 NLS 来自猴肾病毒(SV40)的 T 抗原(相对分子质量 92×10^3)。这个 NLS 由 7 个氨基酸残基构成：Pro－Lys－Lys－Lys－Arg－Lys－Val。其中仅一个氨基酸残基突变就会导致该蛋白在胞质内不正常积累；如果将这段 NLS 序列连接到非亲核蛋白上，则非亲核蛋白就会被转运到核内。此后，又陆续鉴定出一些其他亲核蛋白的 NLS。目前认为 NLS 是存在于亲核蛋白内的一些短的氨基酸序列片段，富含碱性氨基酸残基，如 Lys、Arg，此外还常常含有 Pro。这些氨基酸残基片段可以是一段连续的序列，如上述 SV40 T 抗原的 NLS，也有分成两段存在于亲核蛋白的氨基酸序列中，两段之间往往间隔约 10 个氨基酸残基，如核质蛋白的 NLS。在不同的 NLS 之间尚未发现共有的特征序列。与指导蛋白质跨膜运输的信号肽不同，NLS 序列可存在于亲核蛋白的不同部位，并且在指导亲核蛋白完成核输入后并不被切除。

亲核蛋白通过核孔复合体的转运是分步进行的，根据整个过程对能量的需求可粗略的分为两步：结合(binding)与转移(translocation)。亲核蛋白首先结合到核孔复合体的胞质面，这一步不需要能量，但依赖正常的 NLS；随后的转移步骤则需要 GTP 水解供能。亲核蛋白除了本身具有 NLS 外，其入核转运还需要一些胞质蛋白因子的帮助。目前比较确定的因子有 importinα、importinβ、Ran(一种 GTP 结合蛋白)和 NTF2 等。在它们的参与下，亲核蛋白的入核转运可分为如下几个步骤(图 8－6)：① 亲核蛋白通过 NLS 识别 importinα，与可溶性 NLS 受体 importinα／improtinβ 异二聚体结合，形成转运复合物；② 在importinβ

的介导下，转运复合物与核孔复合体的胞质纤维结合；③ 转运复合物通过改变构象的核孔复合体从胞质面被转移到核质面；④ 转运复合物在核质面与 Ran－GTP 结合，并导致复合物解离，亲核蛋白释放；⑤ 受体的亚基与结合的 Ran 返回胞质，在胞质内 Ran－GTP 水解形成 Ran－GDP 并与 importinβ 解离，Ran－GDP 返回核内再转换成 Ran－GTP 状态。

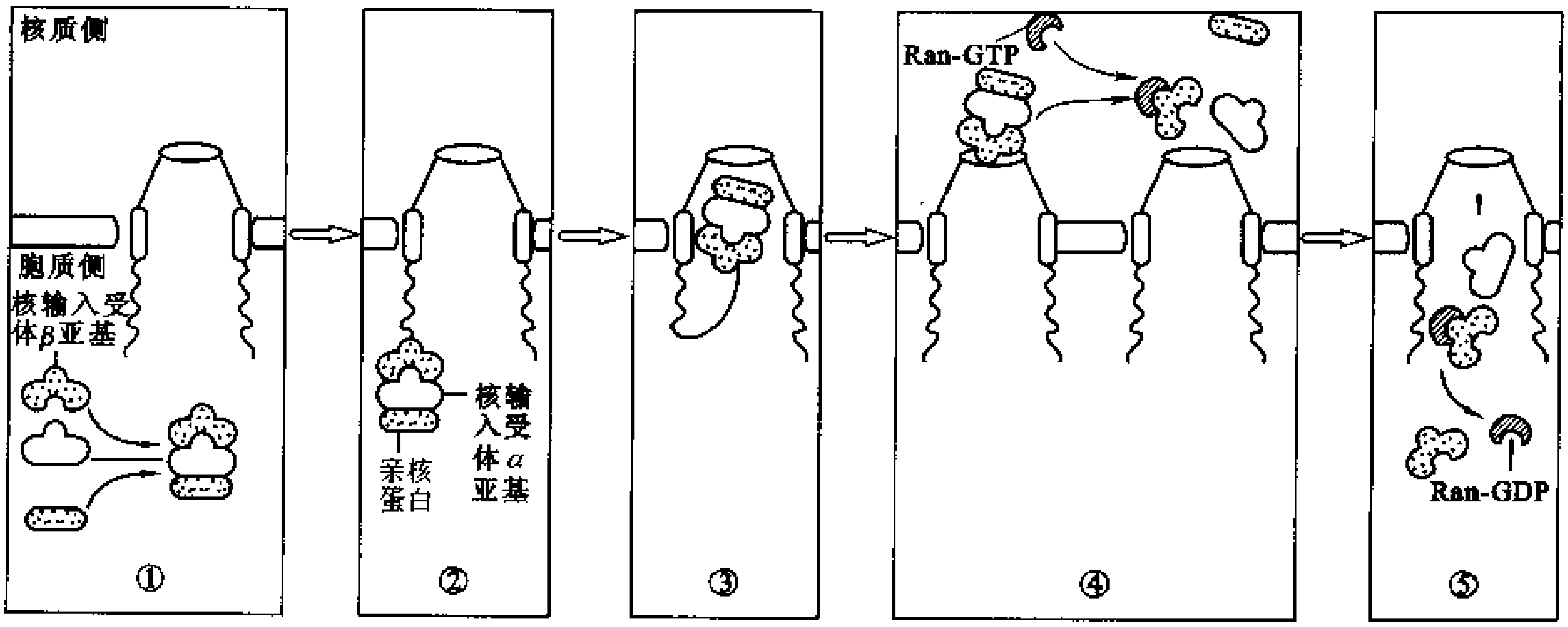


图 8－6　亲核蛋白从细胞质向细胞核输入的过程示意图

应该指出，NLS 只是亲核蛋白入核的一个必要条件，某种亲核蛋白是否被转运入核还受到其他因素的影响。已经发现有很多带有 NLS 的蛋白质由于种种原因滞留在胞质内。它们有的是因为其 NLS 的活性被封闭(masking)，如磷酸化修饰；有的是由于与"胞质滞留因子"(cytoplasmic retention factor)的结合，如与细胞骨架的结合导致亲核蛋白不能自由活动。总之，蛋白质入核转运作为一种重要的核质物质交换与信息交流活动，是受到多种因素综合调节的。

对于 RNA 及核糖体亚单位的出核转运机制了解得较少。真核细胞中 RNA 一般要经过转录后加工、修饰成为成熟的 RNA 分子后才能被转运出核。① 由 RNA 聚合酶 I 转录的 rRNA 分子，总是在核仁中与从胞质中转运进来的核糖体蛋白结合形成核糖体亚单位，以核糖核蛋白颗粒(RNP)的形式离开细胞核，转运过程需要能量；② 由 RNA 聚合酶Ⅲ转录的 5S rRNA 与 tRNA 的转运是一种由蛋白质介导的过程；③ 由 RNA 聚合酶Ⅱ转录的核内不均一 RNA(heterogeneous nuclear RNA，hn RNA)，首先需要在核内进行 5′端加帽和 3′端附加多聚 A 序列以及剪接等加工过程，然后形成成熟的 mRNA 出核。出核转运也是一个需要载体的主动运输过程。最近的研究表明，在细胞核中既有正调控信号保证 mRNA 的出核转运，也有负调控信号防止 mRNA 的前体被错误地运输。由 DNA 转录出来的 mRNA 前体只有在核内经过转录后加工、修饰成为成熟的 RNA 分子后才能被转运出核。目前认为 5′端的 m^7GpppG"帽子"结构对 mRNA 的出核转运

是必要的。防止 mRNA 的错误出核与剪接体(spliceosome)有关,实验证明在剪接体形成与 mRNA 出核转运之间存在竞争。mRNA 的出核转运过程是有极性的,其 5′端首先通过核孔复合体,3′端最后离开细胞核。此外,RNA 分子的出核转运需要蛋白分子的帮助。真核细胞的 snRNA、mRNA 与 tRNA,无论在细胞质还是在细胞核中,都是与相关的蛋白质结合在一起,即以各种 RNP 颗粒的形式存在的。所谓 RNA 的出核转运实际上是 RNA－蛋白质复合体的转运,即 RNA 的核输出离不开特殊的蛋白因子的参与,这些蛋白因子本身含有出核信号。目前人们正致力于寻找在 RNA 分子与核孔复合体之间起桥梁作用的信号与载体。已发现一些与 RNA 共同出核的蛋白因子,如 HIV 病毒的 Rev 蛋白,转录因子 TFⅢA,蛋白激酶 A 抑制因子 PKI 等,含有对它们的出核转运起决定作用的氨基酸序列,命名为核输出信号(nuclear export signal,NES)。此外,有迹象表明入核转运与出核转运之间有某种联系,如它们可能需要某些共同的因子。

第二节 染 色 质

1879 年,W.Flemming 提出了染色质(chromatin)这一术语,用以描述细胞核中能被碱性染料强烈着色的物质。1888 年,Waldeyer 正式提出染色体的命名。经过一个多世纪的研究,人们对这种遗传物质的载体有了比较深人的认识。染色质和染色体是在细胞周期不同阶段可以互相转变的形态结构。下面将间期染色质和中期染色体分成两节叙述,完全是为了考虑章节内容的平衡及教学的方便。

一、染色质的概念及化学组成

染色质是指间期细胞核内由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA 组成的线性复合结构,是间期细胞遗传物质存在的形式。染色体是指细胞在有丝分裂或减数分裂过程中,由染色质聚缩而成的棒状结构。实际上,两者之间的区别主要并不在于化学组成上的差异,而在于包装程度不同,反映了它们处于细胞周期中不同的功能阶段。在真核细胞的细胞周期中,大部分时间是以染色质的形态而存在的。

通过分离胸腺、肝或其他细胞的核,用去垢剂处理后再离心收集染色质进行生化分析,确定染色质的主要成分是 DNA 和组蛋白,还有非组蛋白及少量 RNA。大鼠肝细胞染色质常被当作染色质成分分析模型,其中组蛋白与 DNA 含量之比近于 1:1,非组蛋白与 DNA 之比是 0.6:1,RNA/DNA 比率为 0.1:1。DNA 与组蛋白是染色质的稳定成分,非组蛋白与 RNA 的含量则随细胞生理状态不同而变化。

(一) 染色质 DNA

凡是具有细胞形态的所有生物其遗传物质都是 DNA。只有少数病毒遗传

物质是 RNA。在真核细胞中，每条未复制的染色体包装一条 DNA 分子。一个生物储存在单倍染色体组中的总遗传信息，称为该生物的基因组(genome)。真核生物每个细胞中基因组 DNA 含量比原核生物高得多。大肠杆菌(*E.coli*)的基因组含 4.2×10^6bp，平均基因长 1.2kb，基因数目约 2 350；而真核生物酵母(*S.cerevisiae*)基因组 3～4 倍于大肠杆菌的 DNA，为 1.3×10^7bp，平均基因长 1.4kb，约有 6 100 个基因；果蝇(*D.melanogaster*)高达 40 倍(1.4×10^8bp)，平均基因长 11.3kb，约有 8 750 个基因；人的单倍体基因组几乎高达 800 倍，为 3×10^9bp，平均基因长 16.3kb，约有 125 000 个基因。然而，根据突变分析表明，并非所有基因都是必需基因(essential gene)，酵母基因组有 40%的基因属于非必需基因(nonessential gene)，果蝇基因组只有 5 000 个必需基因。至于如此多的非必需基因如何保存下来尚不清楚，推测它们有可能在生物进化上提供某种选择优势。生物基因组中的遗传信息大体可分两类：一类是负责蛋白质氨基酸组成的信息，以三联体密码(triplet)方式进行编码，巧妙地解决了在有限的小空间储存大量遗传信息的矛盾。细胞中编码 DNA 序列在基因组中只占很小的比例，在高等哺乳类，这一比例大约只有 5%左右。这类编码序列主要是非重复的单一 DNA 序列，一般在基因组中只有一个或几个拷贝；另外一类是中度重复序列 DNA，它们是关于基因选择性表达的信息，这种选择性表现在：不同的物种、个体发育的不同阶段和不同的组织以及不同的细胞类型中，各种基因是关闭还是表达，表达的强度如何，都是各不相同的。这类起调控作用的 DNA 序列在整个基因组中占有很高的比例，并且能与调控蛋白相互作用而修饰自己的双螺旋空间结构，以便更好地为调控蛋白所识别。有些中度重复序列 DNA 具有编码功能，如编码 rRNA 和 tRNA 以及组蛋白的基因，但大部分中度重复序列不编码任何产物，这类重复序列又可分为两类：一类称短散在重复元件(short interspersed elements,SINEs)，典型 SINEs 其长度少于 500 bp，如人和灵长类基因组中大量分散存在的 Alu 家族，人基因组中约有 50 万到 70 万份 Alu 拷贝，相当平均每隔 4 kb 就有一个 Alu 序列；另一类称长散在重复元件(long interspersed elements,LINEs)，典型 LINEs 其长度多于 1 000 bp，如人基因组中 L1 家族，有 100 000个 L1 拷贝。这两类缺少编码功能的中度重复序列 DNA 是物种进化过程中在基因组中可移动的遗传元件，并且影响基因表达。此外，真核细胞基因组中，还含有高度重复 DNA 序列，每个基因组中至少含 10^5 拷贝，约占脊椎动物总 DNA 的 10%。高度重复 DNA 序列由一些短的 DNA 序列呈串联重复排列，可进一步分为几种不同类型：卫星 DNA(satellite DNA)，重复单位长 5～100 bp，不同物种重复单位碱基组成不同，一个物种也可能含有不同的卫星 DNA 序列。主要分布在染色体着丝粒部位，如人类染色体着丝粒区的 α 卫星 DNA 家族，其功能不明。小卫星 DNA(minisatellite DNA)重复单位长 12～100 bp，重复 3 000 次之多，又称数量可变的串联重复序列，每个小卫星区重复序列的拷贝数是高度可变的，因此常用 DNA 指纹技术(DNA finger-printing)作个体鉴定；另外发现小卫星序列的改变可以影响邻近基因的表达，基因的异常表达又导致一系列不良

后效应。微卫星 DNA(microsatellite DNA)重复单位序列最短,只有 1～5 bp,串联成簇长度 50～100bp 的微卫星序列。人类基因组中至少有 30 000 个不同的微卫星位点,具高度微卫星多态性(microsatellite polymorphism),不同个体间有明显差别,但在遗传上却是高度保守的,因此可作为重要的遗传标志,用于构建遗传图谱(genetic map)。

生物的遗传信息储存在 DNA 的核苷酸序列中,生物界物种的多样性也寓于 DNA 分子 4 种核苷酸千变万化的不同排列之中。DNA 分子不仅一级结构具有多样性,而且二级结构也具有多形性(polymorphism)。所谓二级结构是指两条多核苷酸链反向平行盘绕所生成的双螺旋结构。DNA 二级结构构型分三种:B 型 DNA(右手双螺旋 DNA)是"经典"的 Watson-Crick 结构,二级结构相对稳定,水溶液和细胞内天然 DNA 大多为 B 型 DNA;A 型 DNA 是一般 B 型 DNA 的重要变构形式,同样是右手双螺旋 DNA,其分子形状与 RNA 的双链区和 DNA/RNA 杂交分子很相近。第三种是 Z 型 DNA,Z 型 DNA 是左手螺旋,也是 B 型 DNA 的变构形式。三种构型 DNA 的主要特征见表 8－2。

表 8－2　A、B 和 Z 型 DNA 的比较*

主要特征	螺旋类型		
	A	B	Z
螺旋直径	2.3 nm	1.9 nm	1.2 nm
螺旋方向	右手	右手	左手
螺旋值/bp	+34.7°	+34.6°	−30°
bp/每圈螺旋	11.0	10.4	12.0
垂直升距/bp	0.26 nm	0.34 nm	0.57 nm
螺旋轴位置	位于大沟,不穿过碱基对	穿过碱基对	位于小沟,不穿过碱基对
大沟	窄而深	宽而深	平坦
小沟	宽而浅	窄而浅	窄而深

* 引自 Genes Ⅵ,稍加补充

三种构型 DNA 中,特别是大沟的特征在遗传信息表达过程中起关键作用。基因表达调控蛋白都是通过其分子上特定的氨基酸侧链与沟中碱基对两侧潜在的氢原子供体(＝NH)或受体(O 和 N)形成氢键而识别 DNA 遗传信息的。由于大沟和小沟中这些氢原子供体和受体各异以及排列不同,所以大沟携带的信息要比小沟多。此外,沟的宽窄及深浅也直接影响碱基对的暴露程度,从而影响调控蛋白对 DNA 信息的识别。B 型 DNA 是活性最高的 DNA 构象;变构后的 A 型 DNA 仍有活性;变构后的 Z 型 DNA 活性明显降低。人们推测,在生理状态下,由于细胞内各种化学修饰的影响和结合蛋白的作用有可能使三种构型的 DNA 处于一种动态转变之中。此外 DNA 双螺旋能进一步扭曲盘绕形成特定的高级结构,正、负超螺旋是 DNA 高级结构的主要形式。DNA 二级结构的变化与高级结构的变化是相互关联的,这种变化在 DNA 复制与转录中具有重要的生物学意义。

（二）染色质蛋白质

染色质 DNA 结合蛋白负责 DNA 分子遗传信息的组织、复制和阅读。这些 DNA 结合蛋白包括两类：一是组蛋白（histone），与 DNA 非特异性结合；另一类是非组蛋白（nonhistone），与 DNA 特异性相结合。

1．组蛋白

组蛋白是构成真核生物染色体的基本结构蛋白，富含带正电荷的 Arg 和 Lys 等碱性氨基酸，等电点一般在 pH10.0 以上，属碱性蛋白质；可以和酸性的 DNA 紧密结合，而且一般不要求特殊的核苷酸序列，用聚丙烯酰胺凝胶电泳可以将组蛋白区分为 5 种组分：H1、H2A、H2B、H3 和 H4。几乎所有真核细胞都含有这 5 种组蛋白，而且含量丰富，每个细胞每种类型的组蛋白约 6×10^7 个分子。表 8－3 列举了 5 种组蛋白的一些特征。

表 8－3 5 种组蛋白的某些特性

种类	类型	碱性氨基酸			酸性氨基酸	碱性氨基酸/酸性氨基酸	氨基酸残基数	相对分子质量	核小体上位置
		Lys	Arg	Lys/Arg					
H1	极度富含 Lys	29%	1%	29	5%	6.0	215	23 000	连接*
H2A	同上	11%	9%	1.2	15%	1.3	129	14 500	核心
H2B	同上	16%	6%	2.7	13%	1.7	125	13 774	核心
H3	轻度富含 Lys	10%	13%	0.77	13%	1.8	135	15 324	核心
H4	富含 Arg	11%	14%	0.79	10%	2.5	102	11 822	核心

* 现已证明，H1 是与核小体的核心颗粒相当靠近的，认为它连接于 DNA 上，只是一种习惯说法

5 种组蛋白在功能上分为两组：① 核小体组蛋白（nucleosomal histone），包括 H2B、H2A、H3 和 H4，这 4 种组蛋白有相互作用形成聚合体的趋势，它们通过 C 端的疏水氨基酸（如 Val，Ile）互相结合，而 N 端带正电荷的氨基酸（Arg、Lys）则向四面伸出以便与 DNA 分子结合，从而帮助 DNA 卷曲形成核小体的稳定结构。这 4 种组蛋白没有种属及组织特异性，在进化上十分保守，特别是 H3 和 H4 是所有已知蛋白质中最为保守的。例如牛和豌豆的 H4 组蛋白的 102 个氨基酸残基中仅有 2 个不同，而它们的分歧时间已有 3 亿年的历史。这种保守性表明，H3 和 H4 的功能几乎涉及它们所有的氨基酸，以致任何位置上氨基酸残基的突变对细胞都将是有害的。② H1 组蛋白，其分子较大（215 个氨基酸），球形中心在进化上保守，而 N 端和 C 端两个"臂"的氨基酸变异较大，所以 H1 在进化上不如核小体组蛋白那么保守。在构成核小体时 H1 起连接作用，它赋予染色质以极性。H1 有一定的种属和组织特异性，在哺乳类细胞中，组蛋白 H1 约有 6 种密切相关的亚型，氨基酸顺序稍有不同。在成熟的鱼类和鸟类红细胞中，H1 为 H5 取代，有的生物如酵母（*Saccharomyces cerevisae*）缺少 H1，结果酵母细胞差不多所有染色质都表现为活化状态。

2．非组蛋白

与染色体组蛋白不同，非组蛋白（nonhistone）主要是指染色体上与特异 DNA 序列相结合的蛋白质，所以又称序列特异性 DNA 结合蛋白（sequence spe-

cific DNA binding proteins)。利用非组蛋白与特异序列 DNA 亲合的特点，通过凝胶延滞实验(gel retardation assay)，可以在细胞抽提物中进行检测。首先制备一段带有放射性标记的已知特异序列的 DNA。将要检测的细胞抽提物与标记 DNA 混合，进行凝胶电泳。未结合蛋白的自由 DNA 在凝胶上迁移最快，而与蛋白质结合的 DNA 迁移慢，一般结合的蛋白质分子越大，DNA 分子的延滞现象越明显，然后通过放射性自显影分析，即可发现一系列 DNA 带谱，每条带分别代表不同的 DNA－蛋白质复合物。每条带相对应的结合蛋白随后再通过细胞抽提物组分分离方法被进一步分开。

(1) 非组蛋白的特性

① 非组蛋白具多样性和异质性

非组蛋白占染色体蛋白的 60%～70%，不同组织细胞中其种类和数量都不相同，代谢周转快。包括多种参与核酸代谢与修饰的酶类如 DNA 和 RNA 聚合酶、HMG 蛋白(high mobility group proteins,)、核质蛋白、染色体骨架蛋白、肌动蛋白和基因表达调控蛋白等。

② 对 DNA 具有识别特异性

能识别特异的 DNA 序列，识别信息来源于 DNA 核苷酸序列本身，识别位点存在于 DNA 双螺旋的大沟部分。识别与结合靠氢键和离子键。在不同的基因组之间，这些非组蛋白所识别的 DNA 序列在进化上是保守的。这类序列特异性 DNA 结合蛋白具有一个共同特征，即形成与 DNA 结合的螺旋区并具有蛋白二聚化的能力。

③ 具有多种功能

虽然与 DNA 特异序列结合的蛋白质在每个真核细胞中只有 10 000 个分子左右，约占细胞总蛋白的 1/5 万，但却具有多方面的重要功能，包括基因表达的调控和染色质高级结构的形成。如帮助 DNA 分子折叠，以形成不同的结构域，协助启动 DNA 复制，控制基因转录，调节基因表达。

(2) 序列特异性 DNA 结合蛋白的不同结构模式

根据迄今发现的众多的 DNA 特异性结合蛋白的分析，发现它们可分为不同的结合蛋白家族，与 DNA 结合的结构域，分别具有以下不同的结构模式：

① α 螺旋－转角－α 螺旋模式(helix-turn-helix motif)

这是最早在原核基因的激活蛋白和阻抑物(repressor)中发现的。迄今已在百种以上原核细胞和真核生物中发现这种最简单、最普遍的 DNA 结合蛋白的结构模式。这种蛋白与 DNA 结合时，形成对称的同型二聚体(symmetric homodimer)结构模式(图 8－7A)。构成同型二聚体的每个单体由 20 个氨基酸的小肽组成 α 螺旋－转角－α 螺旋结构，两个 α 螺旋相互连接构成 β 转角，其中羧基端的 α 螺旋为识别螺旋(recognition helix)，负责识别 DNA 大沟的特异碱基信息，另一个螺旋没有碱基特异性，与 DNA 磷酸戊糖链骨架接触。在与 DNA 特异结合时，以二聚体形式发挥作用，结合靠蛋白质的氨基酸侧链与特异碱基对之间形成氢键。

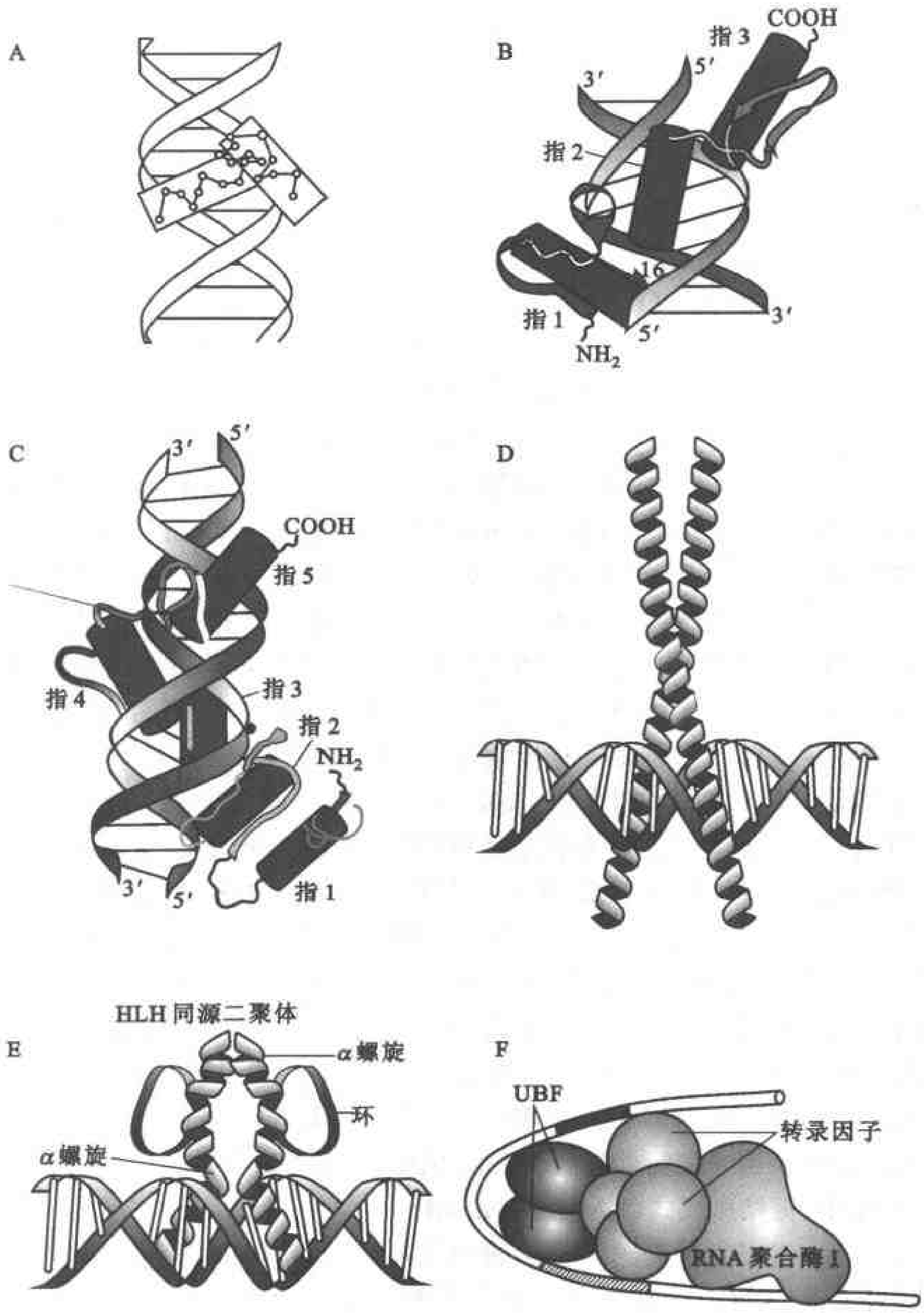


图 8－7 序列特异性 DNA 结合蛋白的不同结构模式

A：α 螺旋－转角－α 螺旋；B、C：锌指；D：Leu 拉链；E：螺旋－环－螺旋结构模式；F：HMG 蛋白及其作用

② 锌指模式(Zinc finger motif)

负责 5S RNA、tRNA 和部分 snRNA 基因转录的 RNA 聚合酶Ⅲ所必需的转录因子 TFⅢA 是首先被发现的锌指蛋白，由 344 个氨基酸组成(相对分子质量 40×10^3)。TFⅢA 含 9 个有规律的锌指重复单位，每个单位 30 个氨基酸残基，其中一对半胱氨酸和一对组氨酸与 Zn^{2+} 形成配位键，每个锌指单位是一个

DNA 结合结构域(DNA－banding domain),每个锌指的 C 端形成 α 螺旋负责与 DNA 结合。这类 Cys_2/His_2 锌指单位的共有序列(consensus sequence)是:Cys－X_{2-4}－Cys－X_3－Phe－X_5－Leu－X_2－His－X_3－His。哺乳类转录因子 SP1 也有类似的锌指结构,由三个锌指单位组成。另一类锌指蛋白含两对半胱氨酸,而不含组氨酸,如哺乳类细胞的甾体类激素受体蛋白(图 8－7B,C),这类 Cys_2/Cys_2 锌指单位的结合 Zn^{2+} 的共有序列是:Cys－X_2－Cys－X_{13}－Cys－X_2－Cys。

③ 亮氨酸拉链模式(Leucine zipper motif,ZIP)

在构建转录复合物(transcription complex)过程中,普遍涉及蛋白与蛋白之间的相互作用,形成二聚体是识别特异 DNA 序列蛋白的相互作用的共同原则,亮氨酸拉链就是富含 Leu 残基的一段氨基酸序列所组成的二聚化结构。这类序列特异性 DNA 结合蛋白家族,包括酵母的转录激活因子(GCN4),癌蛋白 Jun、Fos、Myc 以及增强子结合蛋白(enhancer binding proteins,C/EBP)等。所有这些蛋白的肽链羧基端约 35 个氨基酸残基有形成 α 螺旋的特点,每两圈(7 个氨基酸残基)有一个亮氨酸残基。这样,在 α 螺旋一侧的 Leu 排成一排,两个蛋白质分子的 α 螺旋之间靠 Leu 残基之间的疏水作用力形成一条拉链状结构(图 8－7D)。这类蛋白与 DNA 的特异结合都是以二聚体形式起作用的,但与 DNA 结合的结构域是拉链区相邻的肽链 N 端带正电荷的氨基酸碱性区。

④ 螺旋－环－螺旋结构模式(helix-loop-helix motif,HLH)

HLH 这一结构模式广泛存在于动植物 DNA 结合蛋白中。HLH 由 40～50 个氨基酸组成两个两性 α 螺旋,两个 α 螺旋中间被一个或几个 β 转角组成的环区所分开。每个 α 螺旋由 15～16 个氨基酸残基组成,并含有几个保守的氨基酸残基。具有疏水面和亲水面的两性 α 螺旋有助于二聚体的形成。α 螺旋邻近的肽链 N 端也有带正电荷的氨基酸碱性区与靶 DNA 大沟结合(图 8－7E)。具有螺旋－环－螺旋结构的蛋白家族成员之间形成同源或异源二聚体是这类蛋白与 DNA 结合的必要条件,缺失 α 螺旋的二聚体不能牢固结合 DNA。具有这类结构模式的转录因子如哺乳类的 MyoD、昆虫的 AC－S 等。

⑤ HMG 框结构模式(HMG-box motif)

在发现一组丰富的高速泳动族蛋白(high mobility group proteins)以后,首先发现并命名 HMG 框结构模式。该结构有三个 α 螺旋组成 boomerang-shaped 结构模式,具有弯曲 DNA 的能力。因此,具有 HMG 框结构的转录因子又称“构件因子”(architectural factors),它们通过弯曲 DNA、促进与邻近位点相结合的其他转录因子的相互作用而激活转录。SRY 是一种 HMG 蛋白,在人类男性性别分化中具有关键作用,HMG 蛋白由 Y 染色体上一个基因编码,在诱导睾丸分化途径中一些相关基因的转录活性被 HMG 蛋白所激活。突变的 *SRY* 基因所编码的蛋白不能与 DNA 结合,导致产生性逆转,具有这种表型的个体虽然具有 XY 性染色体对,但却发育成雌性。另一种 HMG 蛋白是 UBF,能激活 RNA 聚合酶 Ⅰ 对 rRNA 基因的转录,UBF 以二聚体形式结合 DNA,两个亚基含有总共 10 个 HMG 框,UBF 通过与 DNA 相互作用,使 DNA 围绕蛋白质形成环化结构,

通常情况下，这段 DNA 所具有的两个调控序列被 120 bp DNA 所分开，环化后使之靠近，与一个或多个转录因子结合（图 8－7F）。

二、染色质的基本结构单位——核小体

20 世纪 70 年代以前，人们关于染色质结构的传统看法认为，染色质是组蛋白包裹在 DNA 外面形成的纤维状结构。1974 年 Kornberg 等人根据染色质的酶切降解和电镜观察，发现核小体（nucleosome）是染色质包装的基本结构单位，提出染色质结构的"串珠"模型，从而更新了人们关于染色质结构的传统观念。

（一）主要实验证据

1．用温和的方法裂解细胞核，将染色质铺展在电镜铜网上，通过电镜观察，未经处理的染色质自然结构为 30 nm 的纤丝，经盐溶液处理后解聚的染色质呈现一系列核小体彼此连接的串珠状结构，念珠的直径为 10 nm（图 8－8）。

A

B

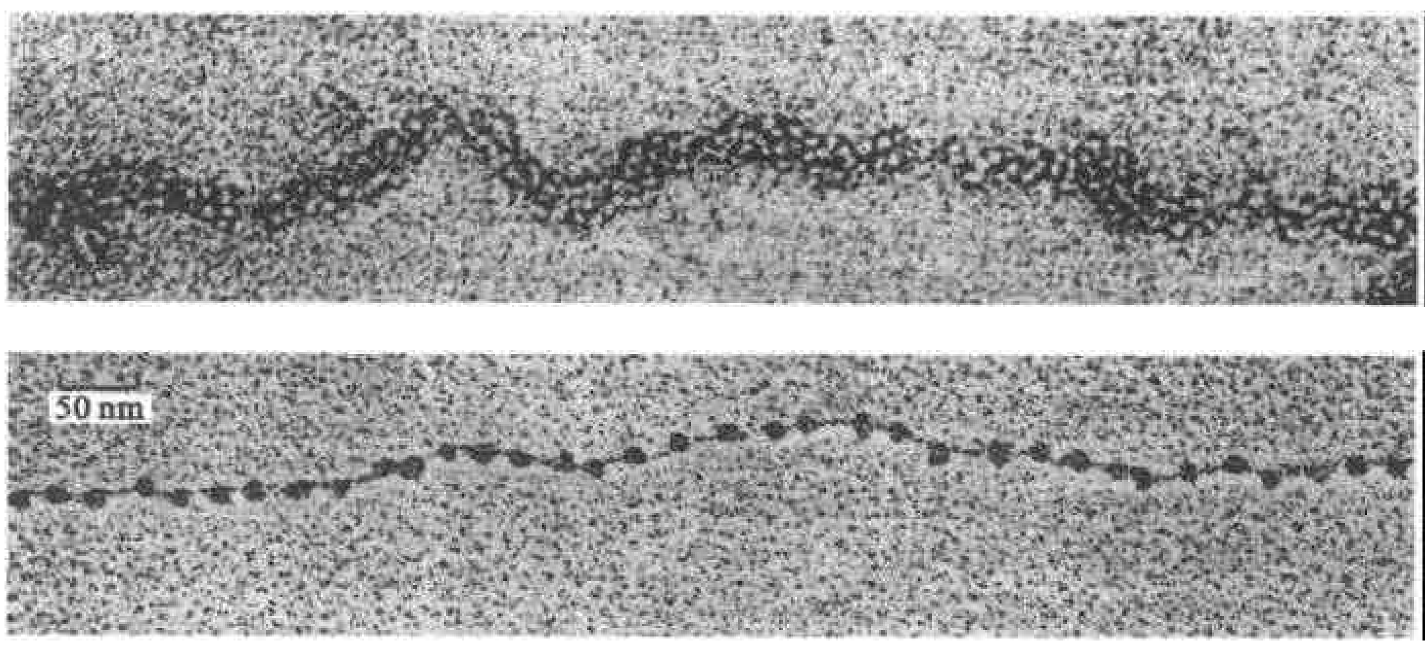


图 8－8 处理前后的染色质丝的电镜照片
A：自然结构：30 nm 的纤丝（引自 B. Hamkalo）；B：解聚的串珠状结构（引自 V. Foe）
（A、B 放大倍数相同）

2．用非特异性微球菌核酸酶（micrococcal nuclease）消化染色质时，经过蔗糖梯度离心及琼脂糖凝胶电泳分析，发现绝大多数 DNA 被降解成大约 200 bp 的片段；如果部分酶解，则得到的片段是以 200 bp 为单位的单体、二体（400 bp）、三体（600 bp）等等。蔗糖梯度离心得到的不同组分，在波长 260 nm 的吸收峰的大小和电镜下所见到的单体、二体和三体的核小体组成完全一致。如果用同样方法处理裸露的 DNA，则产生随机大小的片段群体。从而提示染色体 DNA 除某些周期性位点之外均受到某种结构的保护，避免酶的接近。

3．应用 X 射线衍射、中子散射和电镜三维重建技术，研究染色质结晶颗粒，发现核小体颗粒是直径为 11 nm、高 6.0 nm 的扁圆柱体，具有二分对称性（dyad symmetry），核心组蛋白的构成是先形成 $(H3)_2 \cdot (H4)_2$ 四聚体，然后再与两个

H2A·H2B 异二聚体结合形成八聚体(图 8－9)。

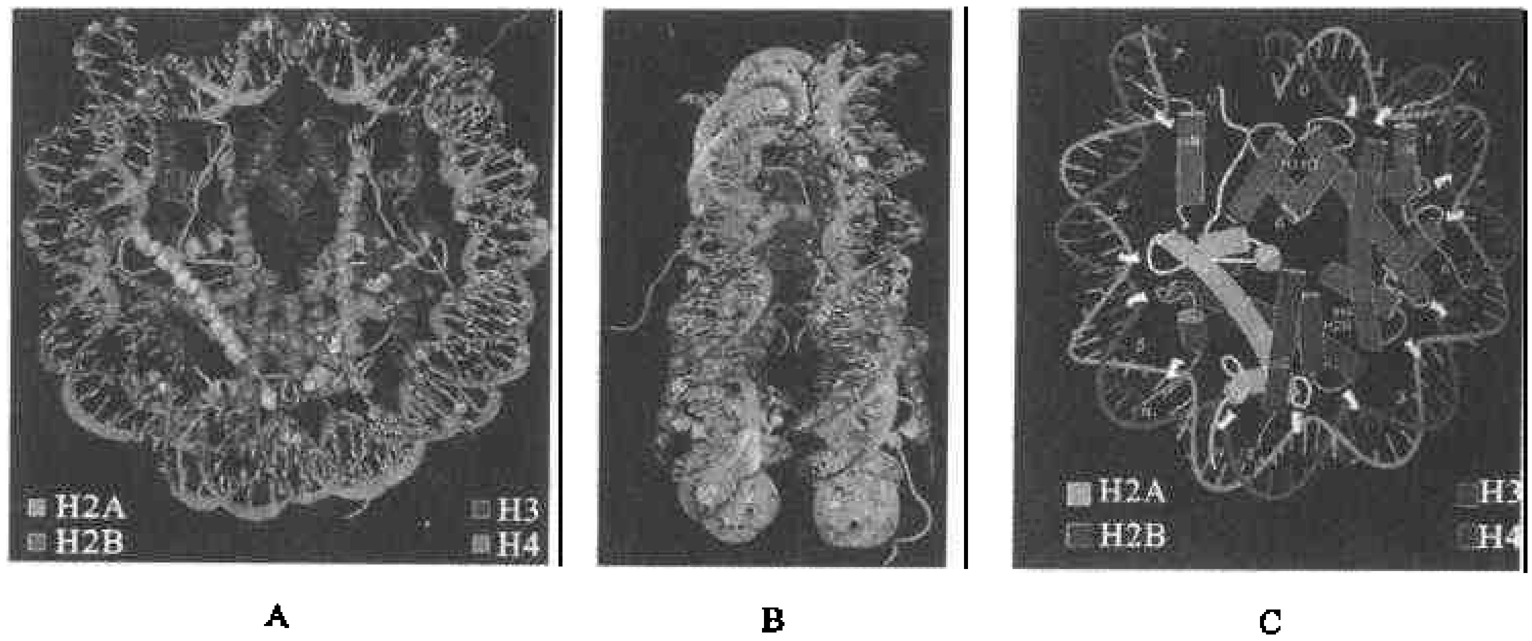


图 8－9　由 X 射线晶体衍射所揭示的核小体三维结构(引自 K. Luger 等,1997)

A: 通过 DNA 超螺旋中心轴所显示的核小体核心颗粒 8 个组蛋白分子的位置;B: 垂直与中心轴的角度所见到的核小体核心颗粒的盘状结构; C:半个核小体核心颗粒的示意模型,一圈 DNA 超螺旋(73 bp)和 4 种核心组蛋白分子,每种组蛋白由三个 α 螺旋和一个伸展的 N 端尾部组成

4. SV40 微小染色体(minichromosome)分析。用 SV40 病毒感染细胞,病毒 DNA 进入细胞后,与宿主的组蛋白结合,形成串珠状微小染色体,电镜观察到 SV40 DNA 为环状,周长 1 500 nm,约 5.0 kb。若 200 bp 相当于一个核小体,则可形成 25 个核小体,实际观察到 23 个,与推断基本一致。如用 0.25 mol/L 盐酸将 SV40 溶解,可在电镜下直接看到组蛋白的聚合体,若除去组蛋白,则完全伸展的 DNA 长度恰好为 5.0 kb。

(二) 核小体结构要点

1. 每个核小体单位包括 200 bp 左右的 DNA 超螺旋和一个组蛋白八聚体以及一个分子的组蛋白 H1。

2. 组蛋白八聚体构成核小体的盘状核心结构,相对分子质量 100×10^3,由 4 个二聚体组成,包括两个 H2A·H2B 和两个 H3·H4。两个 H3·H4 形成四聚体位于核心颗粒中央,两个 H2A·H2B 二聚体分别位于四聚体两侧。每个二聚体通过离子键和氢键结合约 30 bp DNA。

3. 146 bp 的 DNA 分子超螺旋盘绕组蛋白八聚体 1.75 圈。组蛋白 H1 在核心颗粒外结合额外 20 bp DNA,锁住核小体 DNA 的进出端,起稳定核小体的作用。包括组蛋白 H1 和 166 bp DNA 的核小体结构又称染色质小体(chromatosome)。

4. 两个相邻核小体之间以连接 DNA(linker DNA)相连,典型长度 60bp,不同物种变化值为 0～80 bp 不等(图 8－10)。

5. 组蛋白与 DNA 之间的相互作用主要是结构性的,基本不依赖于核苷酸的特异序列。正常情况下不与组蛋白结合的 DNA(如噬菌体 DNA 或人工合成

的 DNA),当与从动植物中分离纯化的组蛋白共同孵育时,可以体外装配成核小体亚单位。实验表明,核小体具有自装配(self-assemble)的性质。

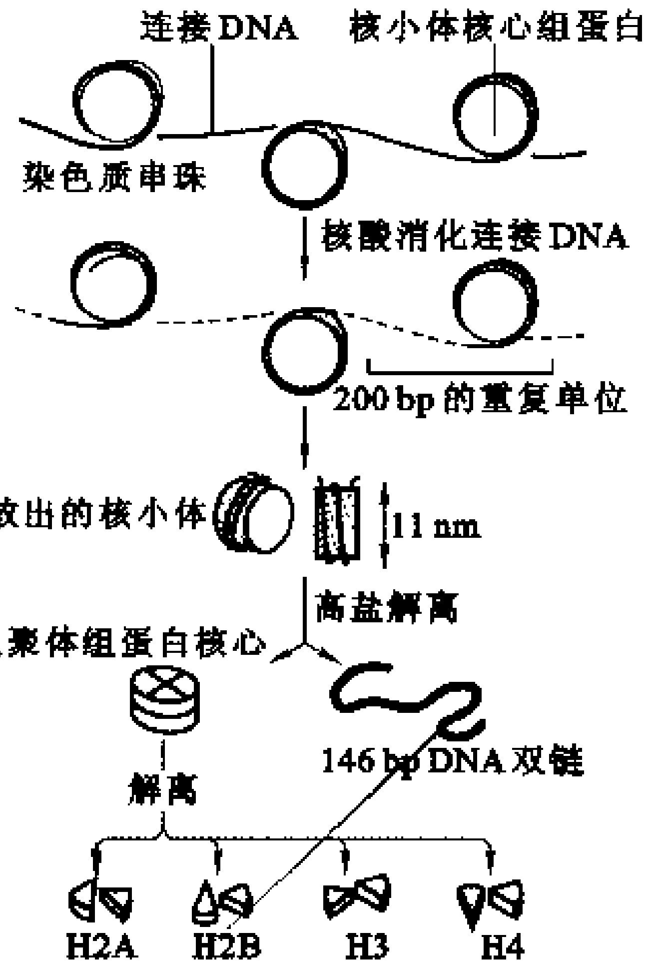


图 8-10 核小体的性质及结构要点示意图(引自 B.Alberts)

在用微球菌核酸酶降解染色质时,反应早期可得到 166 bp 的片段,但不稳定;进一步降解则得到 146 bp 片段,比较稳定,推测可能原因是失去 H1 后,DNA 两端各有 10 bp 的 DNA,易被核酸酶作用而降解

6. 核小体沿 DNA 的定位受不同因素的影响。如非组蛋白与 DNA 特异性位点的结合,可影响邻近核小体的相位(positioning);DNA 盘绕组蛋白核心的弯曲也是核小体相位的影响因素,因为富含 AT 的 DNA 片段优先存在于 DNA 双螺旋的小沟,面向组蛋白八聚体,而富含 GC 的 DNA 片段优先存在于 DNA 双螺旋的大沟,背向组蛋白八聚体,结果核小体倾向于形成富含 AT 和富含 GC 区的理想分布,从而通过核小体相位改变影响基因表达。

三、染色质包装的结构模型

人的每个体细胞所含的 DNA 约 6×10^9bp 分布在 46 条染色体中,总长达 2m,平均每条染色体 DNA 分子长约 5 cm,而细胞核的直径只有约 5~8 μm,这就意味着从染色质 DNA 包装成染色体要压缩近万倍,相当于一个网球含有 2 km 长的细线。

(一) 染色质包装的多级螺旋模型

由 DNA 与组蛋白包装成核小体,在组蛋白 H1 的介导下核小体彼此连接形

成直径约 10 nm 的核小体串珠结构，这是染色质包装的一级结构。不过在生活的细胞中，染色质很少以这种伸展的串珠状形式存在。当细胞核经温和处理后，在电镜下往往会看到直径为 30 nm 的染色质纤维。由核小体串珠结构如何包装成 30 nm 的染色质纤维，其模型之一如图 8－11 所示。在有组蛋白 H1 存在的情况下，由直径 10 nm 的核小体串珠结构螺旋盘绕，每圈 6 个核小体，形成外径 30 nm，内径 10 nm，螺距 11 nm 的螺线管(solenoid)。组蛋白 H1 在螺线管中的空间位置尚不清楚，但对螺线管的稳定起着重要作用。螺线管是染色质包装的二级结构。

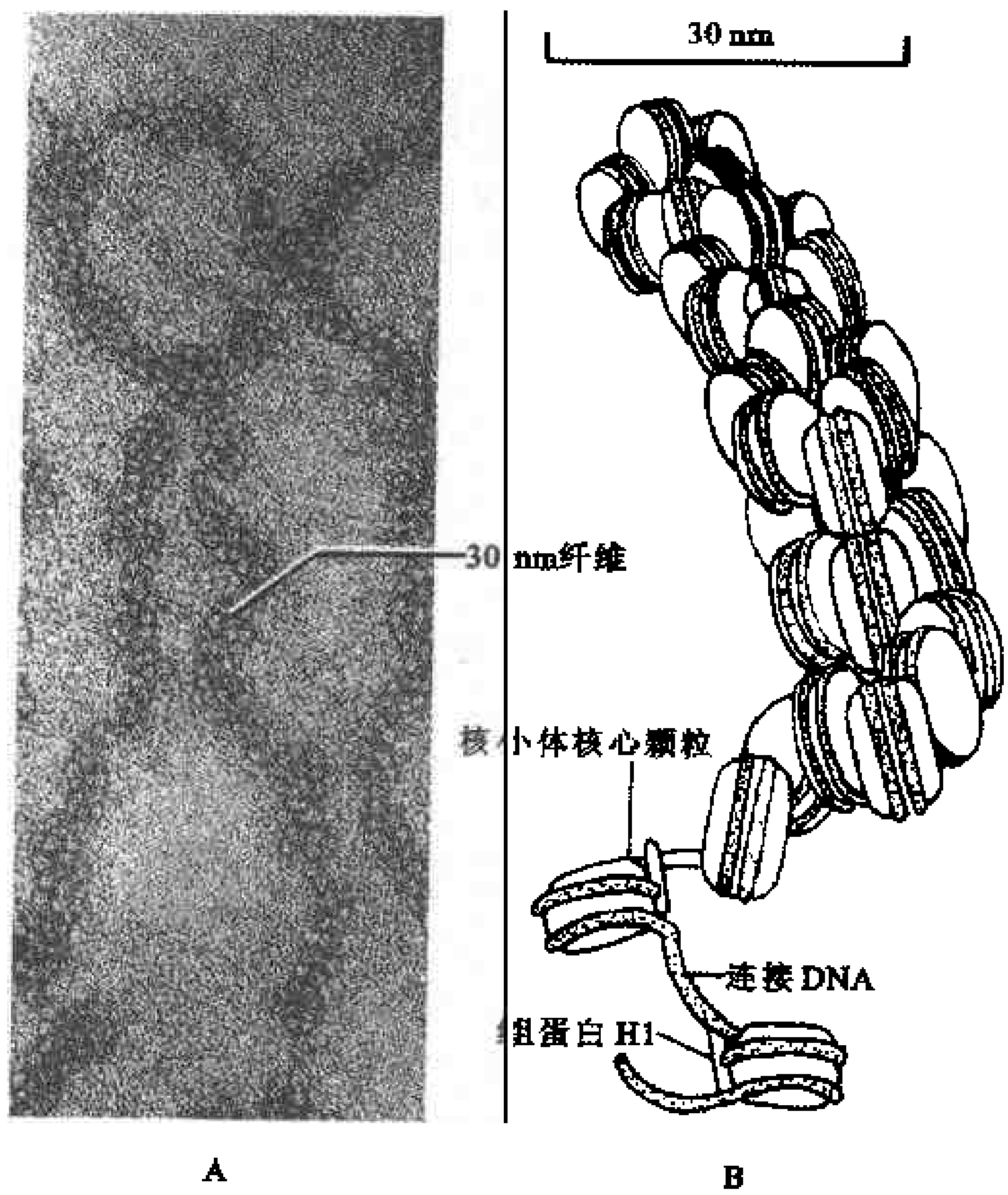


图 8－11　核小体串珠结构如何包装成 30 nm 直径的螺线管的图解(引自 B.Alberts)
A: 30 nm 染色质纤维电镜照片；B: 多级螺旋模型

Bak 等(1977)从人胎儿离体培养的分裂细胞中分离出染色体，经温和处理后，在电镜下看到直径 0.4 μm、长 11～60 μm 的染色线，称为单位线(unit fiber)；在电镜下观察，判明单位线是由螺线管进一步螺旋化形成直径为 0.4 μm 的圆筒状结构，称为超螺线管(supersolenoid)，这是染色体包装的三级结构。这种超螺线管进一步螺旋折叠，形成长 2～10 μm 的染色单体(chromatid)，即染色质包装的四级结构。根据多级螺旋模型(multiple coiling model)，从 DNA 到染色体经过四级包装：

DNA $\xrightarrow{压缩7倍}$ 核小体 $\xrightarrow{压缩6倍}$ 螺线管 $\xrightarrow{压缩40倍}$ 超螺线管 $\xrightarrow{压缩5倍}$ 染色单体

经过四级螺旋包装形成的染色体结构，共压缩了 8 400 倍。

（二）染色体的骨架－放射环结构模型(scaffold radial loop structure model)

关于染色质的包装，虽然在一级和二级结构上已基本取得一致的看法，但对直径 30 nm 的螺线管如何进一步包装成染色体尚有不同意见。

Laemmli 等人用 2 mol/L 的 NaCl 或硫酸葡聚糖加肝素处理 HeLa 细胞中期染色体，除去组蛋白和大部分非组蛋白后，在电镜下可观察到由非组蛋白构成的染色体骨架(chromsomal scaffold)和由骨架伸出的无数的 DNA 侧环(图 8－12)。此外实验观察发现，不论是原核细胞(*E. coli*)的染色体还是两栖类卵母细胞的灯刷染色体或昆虫的多线染色体，几乎都含有一系列的环状结构域(looped domains)，从而提示环状结构可能是染色体高级结构的普遍特征(图 8－13)。



图 8－12　HeLa 细胞去除组蛋白的中期染色体电镜照片

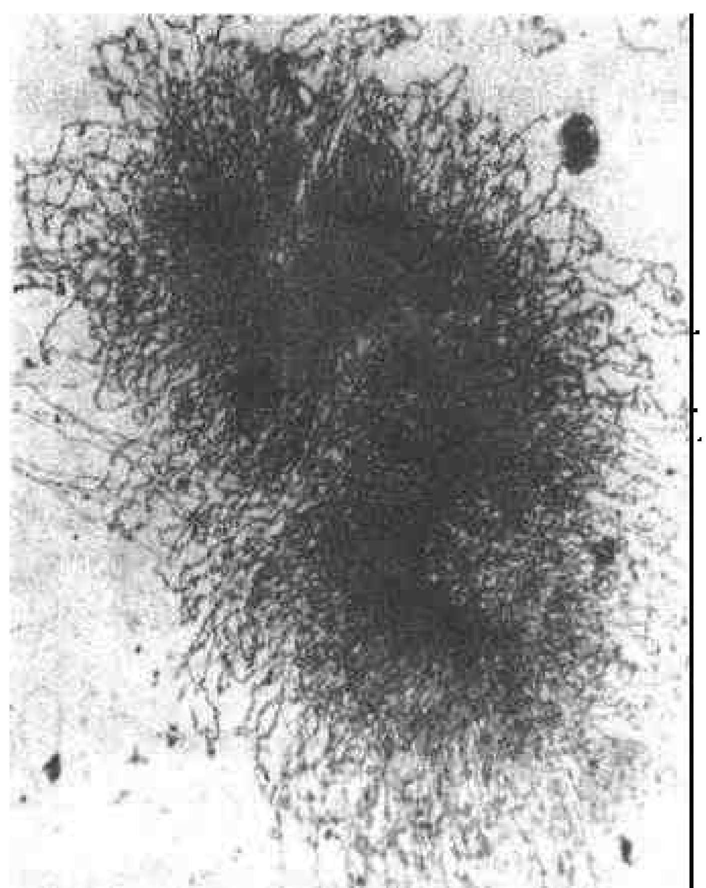


图 8－13　从昆虫 *Oncopeltus* 中得到的有丝分裂染色单体(引自 Victoria Foe)经处理后表现出染色质袢环和染色体轴(电镜观察)

关于染色体骨架和染色质袢环的研究证据，使染色体袢环结构模型近年来引起人们的重视。该模型认为，30 nm 的染色线折叠成环，沿染色体纵轴，由中央向四周伸出，构成放射环。J. Painta 和 D. Coffey(1984)对该模型进行了较详细的描述。首先是直径 2 nm 的双螺旋 DNA 与组蛋白八聚体构建成连续重复的核小体串珠结构，其直径 10 nm。然后按每圈 6 个核小体为单位盘绕成直径 30 nm 的螺线管。由螺线管形成 DNA 复制环，每 18 个复制环呈放射状平面排

列，结合在核基质上形成微带(miniband)。微带是染色体高级结构的单位，大约 10^6 个微带沿纵轴构建成子染色体(表 8－4)。

表 8－4　DNA 袢环的一般性质

DNA 袢环特征	平均数	数值范围
每个环的碱基数(bp)	63 000	30 000～100 000
每个环占有 DNA 的长度	21.1 μm	10～34 μm
每个环所含有的核小体数	315	150～500
环线的直径	30 nm	30 nm
每个环所含螺线管的盘绕数	52	25～83
环的长度	0.52 μm	0.52～0.83 μm
环的高度	0.26 μm	0.12～0.41 μm
DNA 的压缩比	40	40
每个体细胞的总复制环数	95 000	60 000～400 000

上述两种关于染色体高级结构的组织模型，前者强调螺旋化，后者强调环化与折叠。两者都有一些实验与观察的证据，也许在不同的包装阶段这些机制共同起作用，因此以下图作为融两种机制在内的染色质包装模型(图 8－14)。

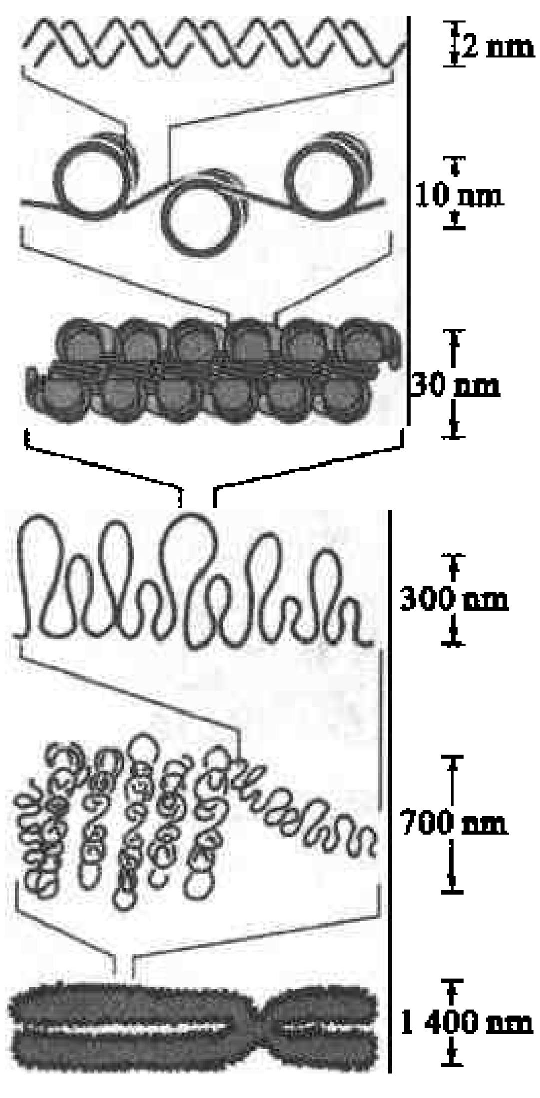


图 8－14　染色体包装的不同组织水平(引自 B. Alberts)

四、常染色质和异染色质

间期染色质按其形态特征和染色性能区分为两种类型：常染色质(euchro-

matin)和异染色质(heterochromatin)。

常染色质是指间期核内染色质纤维折叠压缩程度低,处于伸展状态,用碱性染料染色时着色浅的那些染色质。在常染色质中,DNA 包装比约为$\frac{1}{2\ 000}$~$\frac{1}{1\ 000}$,即 DNA 实际长度为染色质纤维长度的 1 000~2 000 倍。构成常染色质的 DNA 主要是单一序列 DNA 和中度重复序列 DNA(如组蛋白基因和 tRNA 基因)。常染色质并非所有基因都具有转录活性,处于常染色质状态只是基因转录的必要条件,而不是充分条件。

异染色质是指间期核中,染色质纤维折叠压缩程度高,处于聚缩状态,用碱性染料染色时着色深的那些染色质。异染色质又分结构异染色质或组成型异染色质(constitutive heterochromatin)和兼性异染色质(facultative heterochromatin)。结构异染色质指的是各种类型的细胞,除复制期以外,在整个细胞周期均处于聚缩状态,DNA 包装比在整个细胞周期中基本没有较大变化的异染色质。在间期核中,结构异染色质聚集形成多个染色中心(chromocenter),在哺乳类细胞中,这些染色中心随细胞类型和发育阶段而变化。结构异染色质有如下特征:① 在中期染色体上多定位于着丝粒区、端粒、次缢痕及染色体臂的某些节段;② 由相对简单、高度重复的 DNA 序列构成,如卫星 DNA;③ 具有显著的遗传惰性,不转录也不编码蛋白质;④ 在复制行为上与常染色质相比表现为晚复制早聚缩;⑤ 占有较大部分核 DNA,在功能上参与染色质高级结构的形成,导致染色质的区间性,作为核 DNA 的转座元件,引起遗传变异。兼性异染色质是指在某些细胞类型或一定的发育阶段,原来的常染色质聚缩,并丧失基因转录活性,变为异染色质。这类兼性异染色质的总量随不同细胞类型而变化,一般胚胎细胞含量很少,而高度特化的细胞含量较多,说明随着细胞分化,较多的基因渐次以聚缩状态而关闭,从而再也不能接近基因活化蛋白。因此,染色质通过紧密折叠压缩可能是关闭基因活性的一种途径。例如雄性哺乳类细胞的单个 X 染色体呈常染色质状态;而雌性哺乳类体细胞的核内,两条 X 染色体之一在发育早期随机发生异染色质化而失活,在上皮细胞核内,这个异固缩的 X 染色体称性染色质或巴尔氏小体(Barr body),在多形核白细胞的核内,此 X 染色体形成特殊的"鼓槌"结构。因此,检查羊水中胚胎细胞的巴尔氏小体可以预报胎儿的性别。

第三节 染 色 体

染色体(chromosome)是细胞在有丝分裂时遗传物质存在的特定形式,是间期细胞染色质结构紧密包装的结果。

一、中期染色体的形态结构

中期染色体具有比较稳定的形态，它由两条相同的姐妹染色单体(sister chromatid)构成，彼此以着丝粒相连。根据着丝粒在染色体上所处的位置，可将中期染色体分为4种类型：中着丝粒染色体(metacentric chromosome)两臂长度相等或大致相等；近中着丝粒染色体(submetacentric chromosome)；近端着丝粒染色体(acrocentric chromosome)具有微小短臂；端着丝粒染色体(telocentric chromosome)(图8－15；表8－5)。

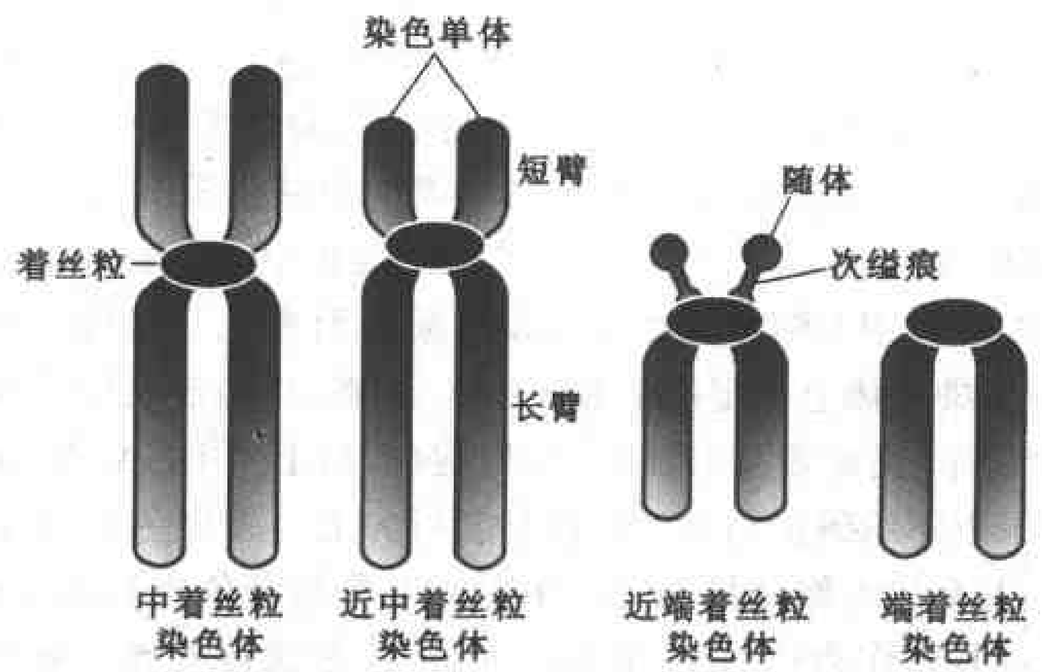


图8－15　根据着丝粒位置进行的染色体分类图示(引自De Robertis)

表8－5　根据着丝粒位置进行的染色体分类

着丝粒位置	染色体符号	着丝粒比[①]	着丝粒指数[②]
中着丝粒	m	1.00～1.67	0.500～0.375
近中着丝粒	sm	1.68～3.00	0.374～0.250
近端着丝粒	st	3.01～7.00	0.294～0.125
端着丝粒	t	7.01～00	0.124～0.000

注：①长臂长度/短臂长度；　②短臂长度/染色体总长度（根据Levan等,1964；Green等,1980）

染色体各部的主要结构：

(1) 着丝粒(centromere)与动粒(又称着丝点,kinetochore)：

着丝粒连接两个染色单体，并将染色单体分为两臂：短臂(p)和长臂(q)。由于着丝粒区浅染内缢，所以也叫主缢痕(primary constriction)。近年来的研究表明，着丝粒是一种高度有序的整合结构，在结构和组成上都是非均一的，至少包括三种不同的结构域：① 沿着着丝粒外表面的动粒结构域(kinetochore domain)。哺乳类动粒超微结构可分为三个区域：一是与着丝粒中央结构域相联系的内板(inner plate)；二是中间间隙(middle space)，电子密度低，呈半透明区；三是外板(outer plate)。在没有动粒微管结合时，覆盖在外板上的第4个区称为纤

维冠(fibrouscorona),由微管蛋白构成。动粒微管与内外板相连,并沿纤维冠相互作用,与内板相联系的染色质是与微管相互作用的位点。已有证据表明,动粒结构域的化学组成包括与动粒结构与功能相关的两类蛋白,以及着丝粒 DNA,但是目前关于动粒的结构模型尚无定论。② 中央结构域(central domain),这是着丝粒区的主体,由串联重复的卫星 DNA 组成。这些重复序列大部分是物种专一的,人染色体的着丝粒 DNA 由 α 卫星 DNA 组成,重复单位 171 bp,每一着丝粒串联重复 2 000 ~30 000 次,可达 250 kb 至 400 kb,但不同染色体着丝粒的 α 卫星 DNA 序列存在差别。其中一个亚类含有 17 bp 的 DNA 模式(5′CTTCGTTGGAAACGGGA3′),能与动粒蛋白 CENP-B 结合,这一 DNA 模式被称为 CENP-B 框。根据免疫印迹(immunoblots)分析,在哺乳类染色体着丝粒区已发现 CENP-A(17×10^3)、B(80×10^3)、C(140×10^3)、E(312×10^3)和 F(330×10^3)5 种动粒蛋白,这些动粒蛋白和细胞分裂及其调控有密切关系,因而也是极为保守的。③ 位于着丝粒内表面的配对结构域(pairingdomain) 代表中期姐妹染色单体相互作用的位点。已经发现有两类蛋白:一是内部着丝粒蛋白 INCENP(inner centromere protein);另一类是染色单体连接蛋白 clips(chromatid linking proteins),两者与染色单体配对有关(图 8-16)。

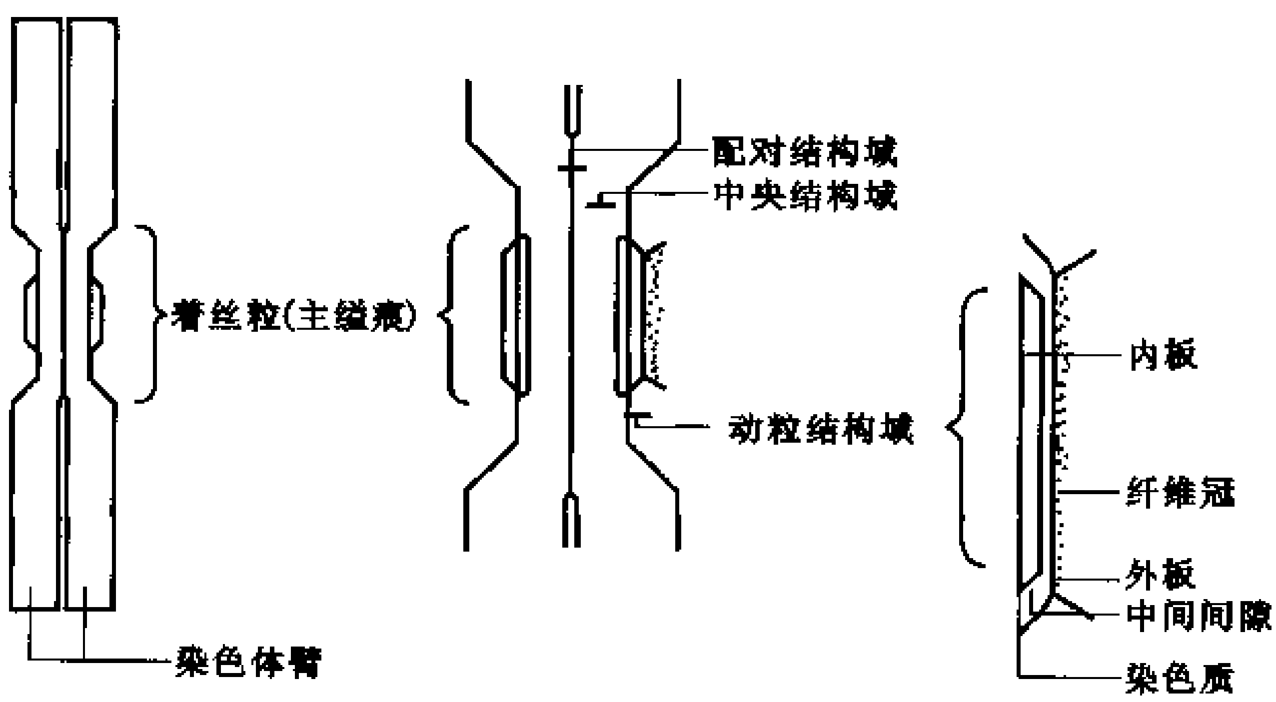


图 8-16 着丝粒的结构域组织(引自 J.B.Rattner,1991)

虽然三种结构域具有不同的功能,但它们并不独自发挥作用,正是三种结构域的整合功能,确保了细胞在有丝分裂中染色体与纺锤体整合,发生有序的染色体分离。

(2) 次缢痕(secondary constriction)

除主缢痕外,在染色体上其他的浅染缢缩部位称次缢痕。它的数目、位置和大小是某些染色体所特有的形态特征,因此也可以作为鉴定染色体的标记。

(3) 核仁组织区(nucleolar organizing region,NOR)

位于染色体的次缢痕部位,但并非所有次缢痕都是 NOR。染色体 NOR 是

rRNA 基因所在部位(5SrRNA 基因除外),与间期细胞核仁形成有关。

(4) 随体(satellite)

指位于染色体末端的球形染色体节段,通过次缢痕区与染色体主体部分相连。它是识别染色体的重要形态特征之一,有随体的染色体称为 sat 染色体。

(5) 端粒(telomere)

端粒是染色体两个端部特化结构。端粒通常由富含鸟嘌呤核苷酸(G)的短的串联重复序列 DNA 组成(TEL DNA),伸展到染色体的 3′端。一个基因组内的所有端粒都是由相同的重复序列组成,但不同物种的端粒的重复序列是不同的。哺乳类和其他脊椎动物端粒的重复序列中的保守序列是 TTAGGG,串联重复 500~3 000 次,序列长度在 2 kb 到 20 kb 之间不等。端粒的生物学作用在于维持染色体的完整性和个体性,与染色体在核内的空间排布及减数分裂时同源染色体配对有关。

二、染色体 DNA 的三种功能元件

在细胞世代中确保染色体的复制和稳定遗传,染色体起码应具备三种功能元件(functional elements):一个 DNA 复制起点,确保染色体在细胞周期中能够自我复制,维持染色体在细胞世代传递中的连续性;一个着丝粒,使细胞分裂时已完成复制的染色体能平均分配到子细胞中;最后,在染色体的两个末端必须有端粒,保持染色体的独立性和稳定性。构成染色体 DNA 的这三种关键序列(key sequence)称为染色体 DNA 的功能元件(图 8－17)。近年来采用分子克隆技术把真核细胞染色体的复制起点、着丝粒和端粒这三种 DNA 关键序列分别克隆成功,并把它们互相搭配或改造而构成所谓“人造微小染色体”(artificial minichromosome)。

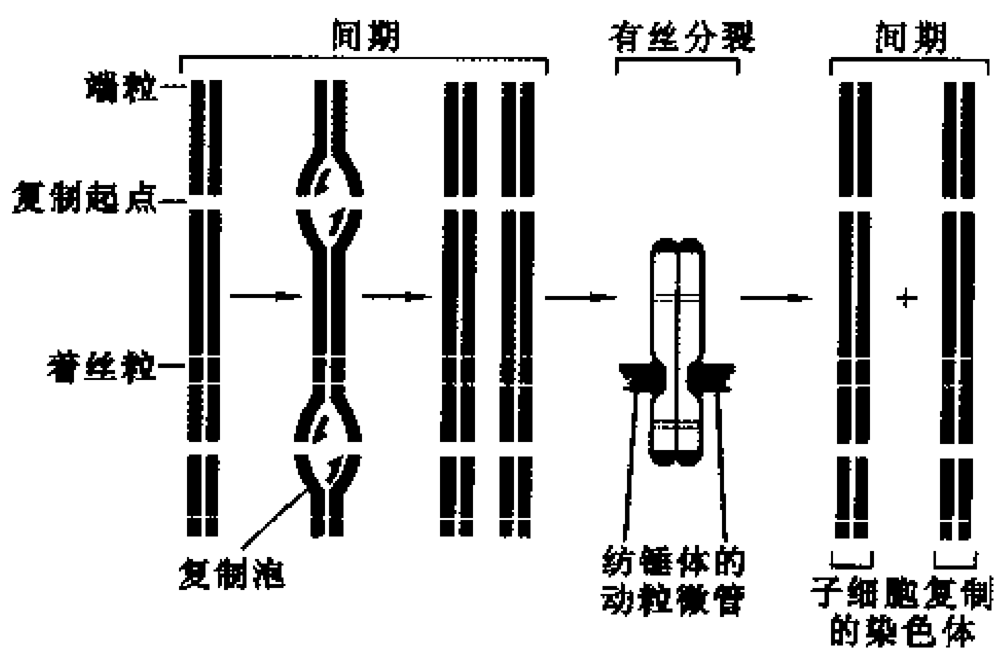


图 8－17 真核细胞染色体的三种功能元件示意图(引自 B. Alberts)

1. 自主复制 DNA 序列(autonomously replicating DNA sequence,ARS)

应用 DNA 重组技术,将带有正常酵母亮氨酸合成酶 *leu* 基因的 DNA 限制酶片段重组到大肠杆菌的质粒中,用这种重组质粒去转化亮氨酸合成代谢缺陷型酵母细胞,发现单纯质粒不能转化酵母细胞,而重组质粒能在酵母细胞中复制、表达和遗传,可见该酵母 DNA 插入片段除含有 *leu* 基因外,还含有一段酵母染色体自主复制的 DNA 序列,称为 ARS。该序列首先在酵母基因组 DNA 序列中发现,它能使含有这一序列的重组质粒高效转化酵母细胞,并能在酵母中独立于宿主染色体而存在(图 8-18)。根据不同来源的 ARS 的 DNA 序列分析,发现它们都具有一段 11～14 bp 的同源性很高的富含 AT 的共有序列(consensus sequence),同时证明这段共有序列及其上、下游各 200 bp 左右的区域是维持 ARS 功能所必需的。现在已利用双向电泳定位复制起点的技术,直接证明了 ARS 在质粒以及酵母染色体上与复制起点(replication origin)共定位的现象。绝大多数真核细胞的染色体含有多个复制起点,以确保全染色体快速复制。现在还没有确定真核生物的复制起点的 DNA 序列是否具有固定模式,但大多包含一个富含 AT 的序列。

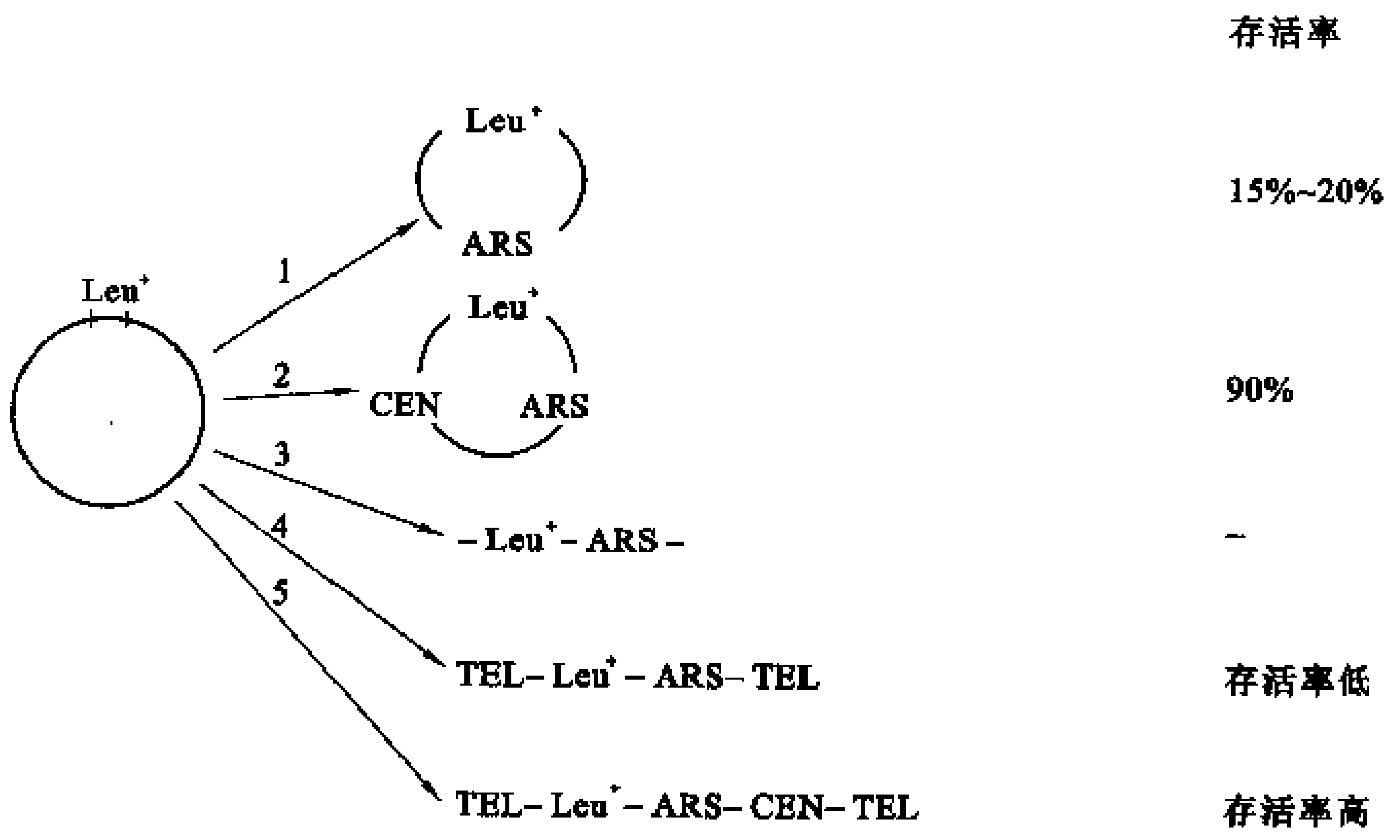


图 8-18 通过酵母亮氨酸合成酶缺失细胞的转染证实染色体功能元件的实验

2. 着丝粒 DNA 序列(centromere DNA sequence, CEN)

上述插入 ARS 的重组质粒,虽然能在酵母细胞中复制和表达,但由于它缺少着丝粒,因此不能在酵母细胞有丝分裂时平均分配到子细胞中去。于是设法把酵母染色体上的着丝粒 DNA 序列(CEN)插入到这个含 ARS 的重组质粒中,结果这种新的插有酵母染色体的 ARS 和 CEN 序列的重组质粒,在有丝分裂中便表现出与正常染色体相似的复制与分离行为。根据不同来源的 CEN 序列分析,发现它们的共同特点是有两个彼此相邻的核心区,一个是 80～90 bp 的 AT 区,另一个是 11 bp 的保守区。通过 CEN 缺失损伤试验或插入突变试验,发现

一旦伤及这两个核心区序列，CEN 即表现丧失其生物学功能。

3. 端粒 DNA 序列(telomere DNA sequence，TEL)

如果将插入 ARS 和 CEN 序列的环状重组质粒 DNA 在单一位点切开，形成一个具有两个游离端的线性 DNA 分子，虽然可以在酵母细胞中复制并附着到有丝分裂的纺锤体上，但最终要从子细胞中丢失，结果细胞无法生长。如果在切开的线性 DNA 两端加上 TEL 序列，则转染细胞生长。这是因为环状 DNA 变成线性 DNA 分子以后无法解决"末端复制问题"，即新合成的 DNA 链 5′末端 RNA 引物被切除后变短的问题。真核细胞染色体端粒的重复序列不是染色体 DNA 复制时连续合成的，而是由端粒酶(telomerase)合成后添加到染色体末端。端粒酶是一种核糖核蛋白复合物，具有逆转录酶的性质，以物种专一的内在的 RNA 作模板，把合成的端粒重复序列再加到染色体的 3′端（图 8－19）。人的生殖系细胞染色体末端比体细胞染色体末端长几千个碱基对，这是因为迄今为止只发现在生殖系细胞和部分干细胞里有端粒酶活性，而在所有体细胞里则尚未发现端粒酶的活性。因此，端粒起到细胞分裂计时器的作用。不管是体内还是体外，体细胞每分裂一次，端粒重复序列就缩短一些。表明端粒重复序列的长度与细胞分裂次数和细胞的衰老有关。肿瘤细胞具有表达端粒酶活性的能力，使癌细胞得以无限制地增殖。

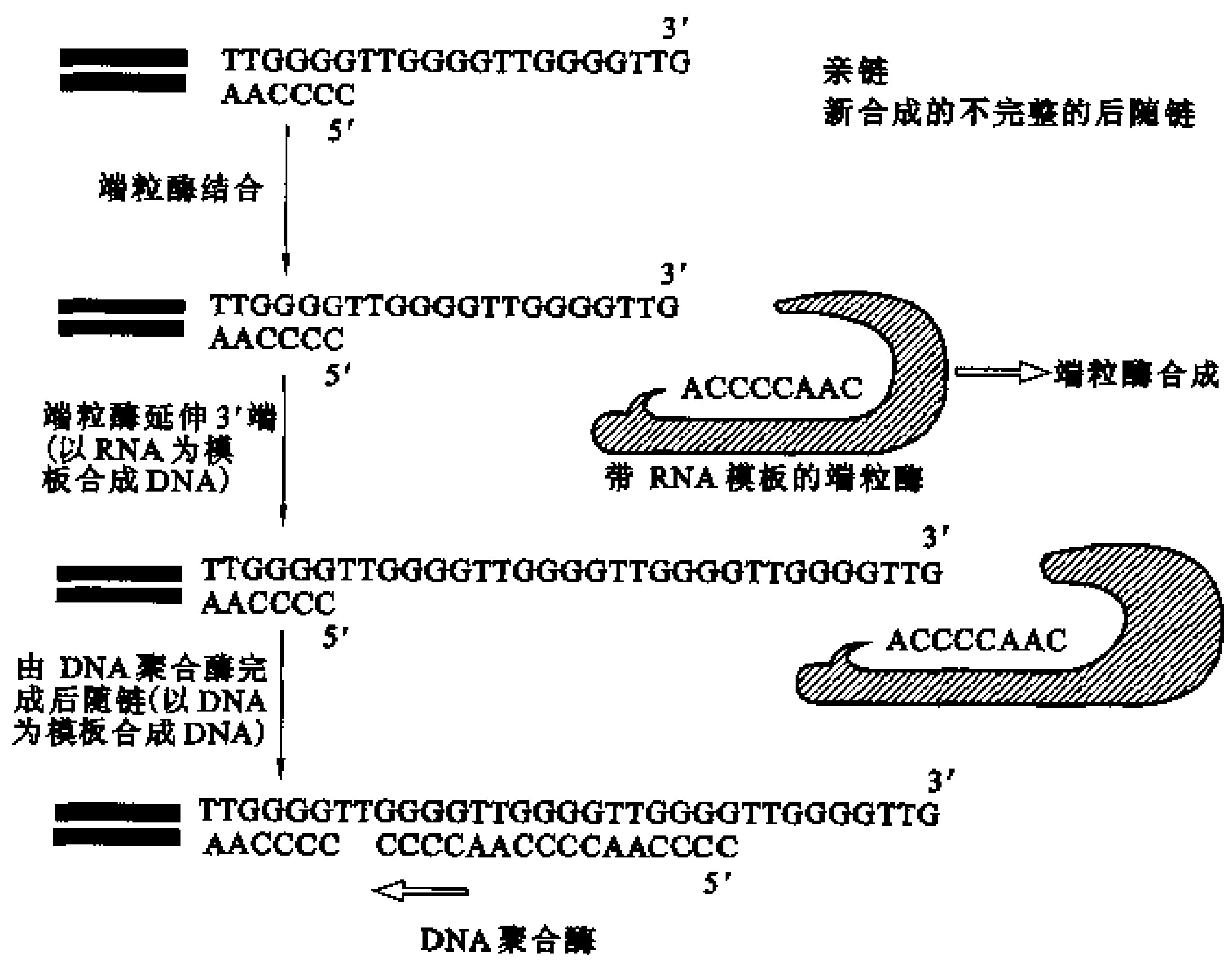


图 8－19　端粒酶的作用

三、核型与染色体显带

核型(karyotype)一词在 20 世纪 20 年代首先由苏联学者 T.A.Levzky 等人提出。核型分析的发展有三项技术起了很重要的促进作用。一是 1952 年美籍华人细胞学家徐道觉发现的低渗处理技术,使中期细胞的染色体分散良好,便于观察;二是秋水仙素的应用便于富集中期细胞分裂相;三是植物凝集素(PHA)刺激血淋巴细胞转化、分裂,使以血培养方法观察动物及人的染色体成为可能。

核型是指染色体组在有丝分裂中期的表型,包括染色体数目、大小、形态特

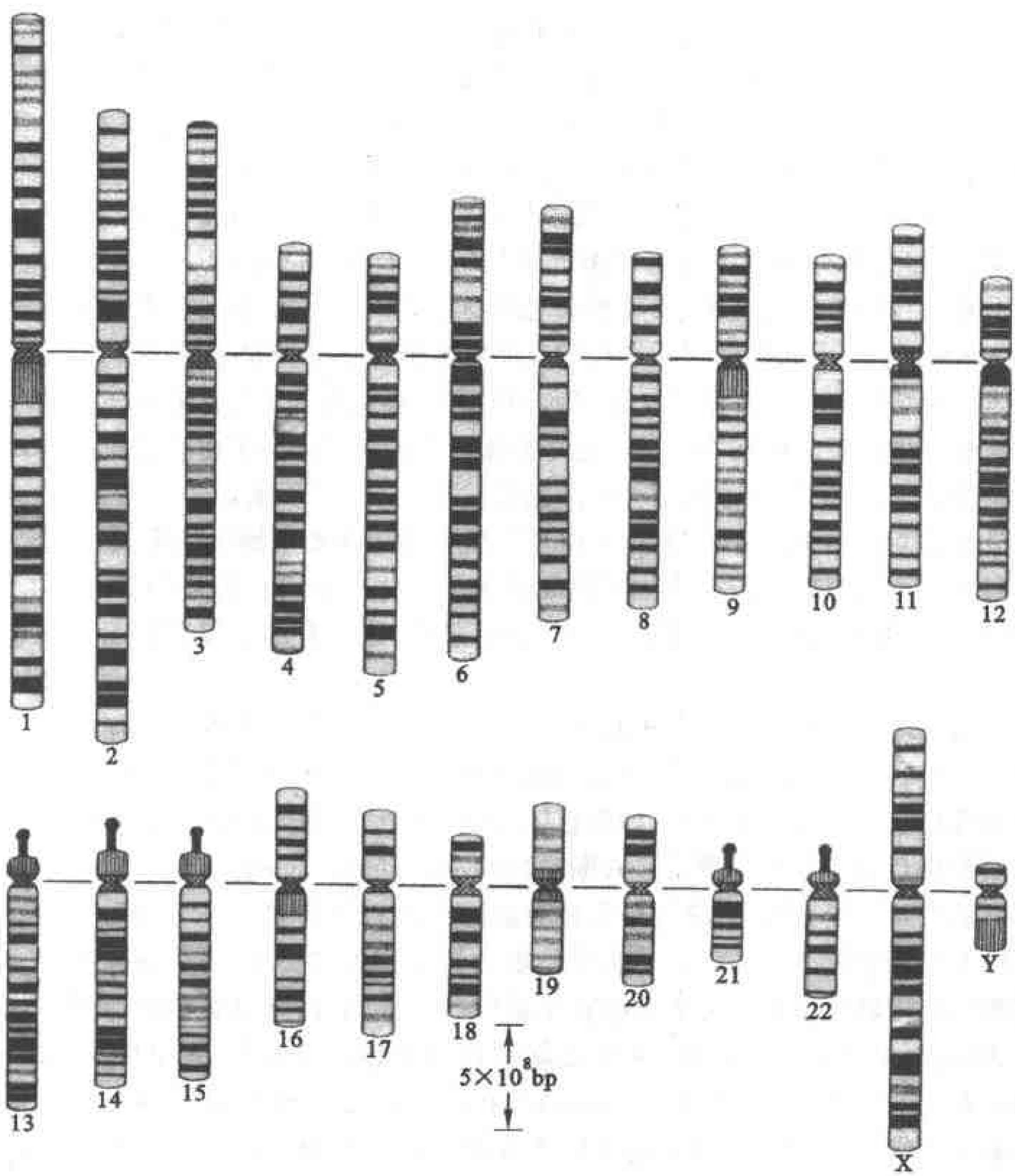


图 8-20 正常男人显带核型模式图(引自 U.Franke,1981)

征等。核型分析是在对染色体进行测量计算的基础上,进行分组、排队、配对并进行形态分析的过程。核型分析对于探讨人类遗传病的机制、物种亲缘关系与进化、远缘杂种的鉴定等都有重要意义。将一个染色体组的全部染色体逐个按其特征绘制下来,再按长短、形态等特征排列起来的图像称为核型模式图(idiogram),它代表一个物种的核型模式(图 8-20)。

在染色体显带技术发展之前,核型分析主要是根据染色体形态和着丝粒位置的差别来进行的,但有时对染色体仍不易精确识别和区分。1968 年由瑞典细胞学家 Casperson 首先建立的染色体 Q 带技术及其以后的发展,为核型研究提供了有力的工具。Q 带技术即喹吖因荧光染色技术,显示中期染色体经氮芥喹吖因或双盐酸喹吖因染色以后,在紫外线照射下呈现出荧光亮带和暗带。一般富含 AT 碱基的 DNA 区段表现为亮带,富含 GC 碱基的 DNA 区段表现为暗带。G 带即 Giemsa 带,将中期染色体制片经胰酶或碱、热、尿素、去污剂等处理后再用 Giemsa 染料染色后所呈现的染色体区带。一般来说,G 带与 Q 带相符,但也有例外,如 Q 带显示的人 Y 染色体的特异荧光,在 G 带带型上并不出现。R 带是指中期染色体经磷酸盐缓冲液保温处理,以吖啶橙或 Giemsa 染色后所显示的带型,和 G 带明暗相间带型正好相反,所以又称反带(reverse bands)。C 带主要显示着丝粒结构异染色质,及其他染色体区段的异染色质部分。T 带又称末端带(terminal bands),是染色体端粒部位经吖啶橙染色后所呈现的区带,在分析染色体末端结构畸变时有用。N 带又称 Ag-As 染色法,主要用于染核仁组织者区的酸性蛋白质。1975 年以来,美国细胞遗传学家 Yunis 等建立了染色体高分辨显带技术,用氨甲喋呤使培养的细胞同步化后,再用秋水仙胺短暂处理,获得大量晚前期和早中期分裂相,这些时期的染色体比典型中期染色体长,显带后可得到更多更细的带纹。在人体细胞晚前期染色体组中可以分辨出 843 ~1 256 条带,而中期染色体只能观察到 320~550 条带,这更有助于发现细微的染色体异常。

染色体显带技术最重要的应用就是明确鉴别一个核型中的任何一条染色体,乃至某一个易位片段。同时显带技术也用于染色体基因定位和研究物种的核型进化及可能的进化机制,如染色体着丝粒的罗伯逊式融合(Robertsonian fusion)与染色体着丝粒的罗伯逊式断裂(Robertsonian fission)。

从人到果蝇,有丝分裂的染色体普遍存在特殊的带型。一个物种某一条染色体上的标准带型在进化上是非常稳定的特征。这就提示,染色体带作为更大范围的结构域对细胞的功能可能是重要的。有人估计,即使最细的带纹也应含有 30 或更多的环状结构域,并且已知富含 AT 的带和富含 GC 的带都含有基因。近年来发展的显带染色体显微切割和分子微克隆技术,已有可能研究染色体某几个带纹的 DNA 性质,这是联系细胞遗传学与分子遗传学之间的重要桥梁。

四、巨大染色体

在某些生物的细胞中，特别是在发育的某些阶段，可以观察到一些特殊的、体

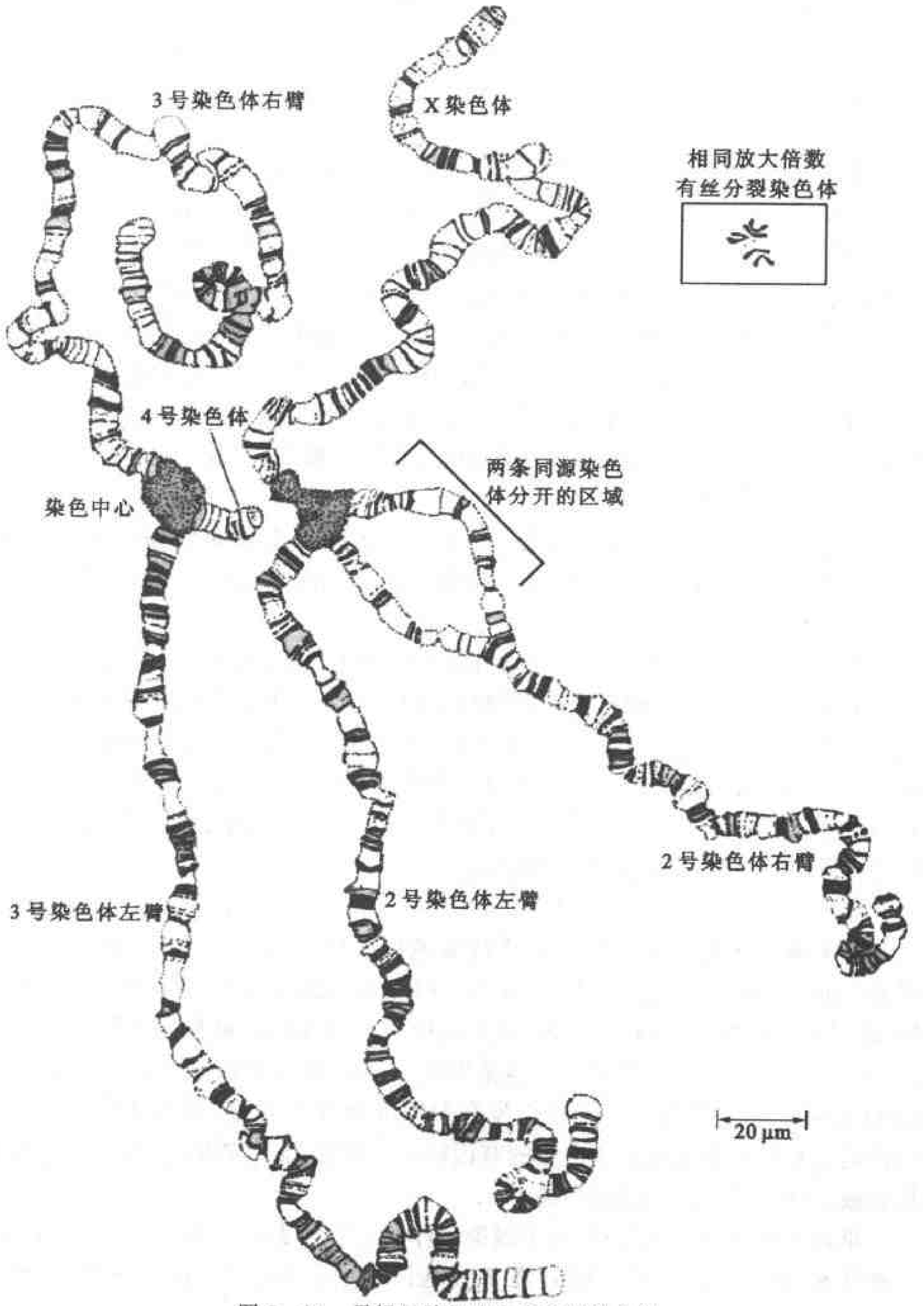


图 8－21 果蝇唾腺细胞全套多线染色体
压片法制备的4对配对的同源染色体，着丝粒区连接，聚集形成大的染色中心
（引自 T.S.Painter）

积很大的染色体，包括多线染色体（polytene chromosome）和灯刷染色体（lampbrush chromosome），这两种染色体总称为巨大染色体（giant chromosome）。

（一）多线染色体

多线染色体是1881年由意大利细胞学家Balbiani首先在双翅目摇蚊幼虫的唾腺细胞中发现的，它存在于双翅目昆虫的幼虫组织细胞，如唾腺、气管、肠和马尔比基氏管。此外，在不同植物的不同类型的细胞中，如胚珠细胞（胚乳、胚柄和反足细胞），也发现多线染色体。

1．多线染色体的来源

多线染色体来源于核内有丝分裂（endomitosis），即核内DNA多次复制而细胞不分裂，产生的子染色体并行排列，且体细胞内同源染色体配对，紧密结合在一起，从而阻止染色质纤维进一步聚缩，形成体积很大的多线染色体。多线化的细胞处于永久间期，并且体积也相应增大。同种生物的不同组织以及不同生物的同种组织的多线化程度各不相同。在果蝇唾腺细胞中，染色体进行10次DNA复制，因而形成$2^{10}=1\,024$条同源DNA拷贝，形成的多线染色体比同种有丝分裂染色体长200倍以上，4条配对的染色体全长可达2 mm。配对染色体的异染色质部位结合在一起形成的染色中心，复制次数很少（图8－21）。

2．多线染色体的带及间带

光镜下观察多线染色体，可见一系列交替分布的带和间带（interbands），每条带和间带代表了由1 024个拷贝并行排列的染色质环状结构域彼此对应包装的结果（图8－22）。

在多线染色体上估计有85%的DNA分布在带上，15%的DNA分布在间带。带区的染色质包装程度比间带染色质高得多，所以带区呈现深染而间带浅染。在果蝇总基因组中，约有5 000条带和5 000条间带。每条染色质纤维的带区约含3 000～300 000 bp（取决于带的宽窄）。多线染色体上带的数目、形态、大小及分布位置都很稳定。每条带能根据它的宽窄及间隔予以识别，对每条带给以标号，从而得到多线染色体的带谱。

3．多线染色体与基因活性

在果蝇个体发育的某个阶段，多线染色体的某些带区变得疏松膨大而形成胀泡（puff）。最大的胀泡叫Balbiani环。用^3H标记的尿嘧啶核苷掺入多线染色体，放射自显影检测，发现胀泡被标记，说明胀泡是基因活跃转录的形态学标志（图8－23）。控制果蝇多线染色体基因转录活性的主要因素之一是蜕皮激素（ecdysone）。这种激素水平在幼虫发育期间周期性地变化，从而诱导那些编码每次蜕皮和蛹化所需要的蛋白质的基因转录。因此，胀泡的出现、发育和消失过程直接反映了基因转录的活性谱。

早期遗传学分析认为，果蝇多线染色体一条带代表一个基因，一个基因编码一种基本蛋白。Bossy等（1984）在果蝇基因组中，克隆出一段315 kb的连续DNA序列，以该DNA为探针，检测该区段DNA所转录的mRNA，结果发现mRNA的种类是被鉴定的带的数目的3倍，所以把每条带看作代表一个特异的

基因区更为恰当。最近的研究表明，多线染色体的带和间带都含有基因，有可能持家基因（housekeeping gene）位于间带，而有细胞类型特异性的“奢侈”基因（luxury gene）位于带上。

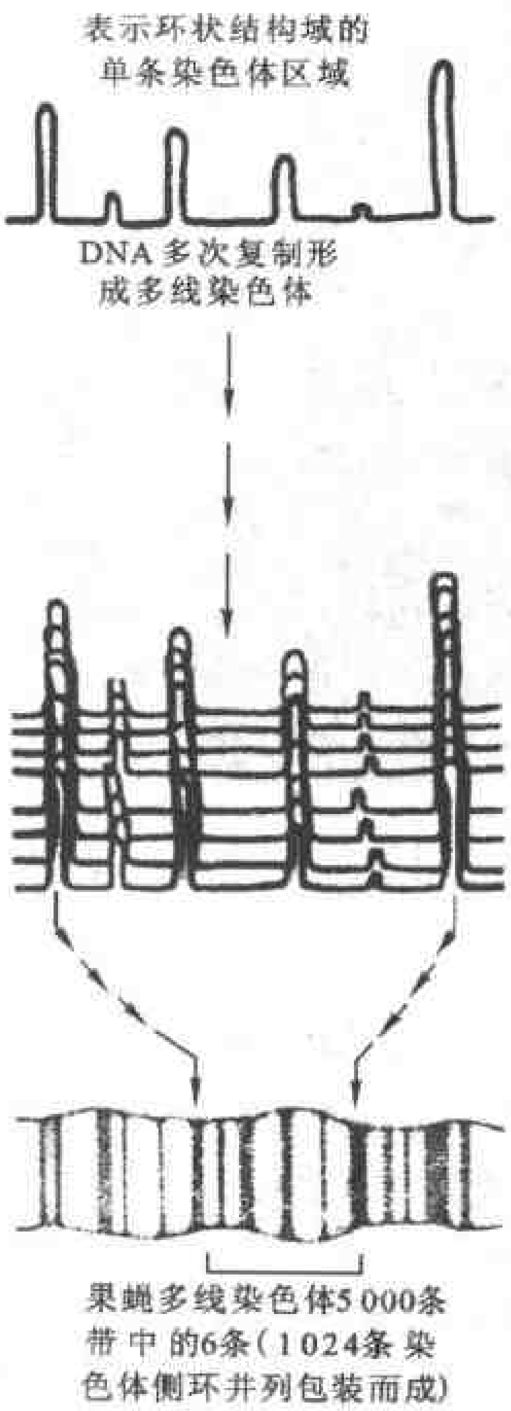


图 8-22　图解表明多线染色体上的带是如何通过同源染色体绊环区对应并行排列而成的（引自 B. Alberts）

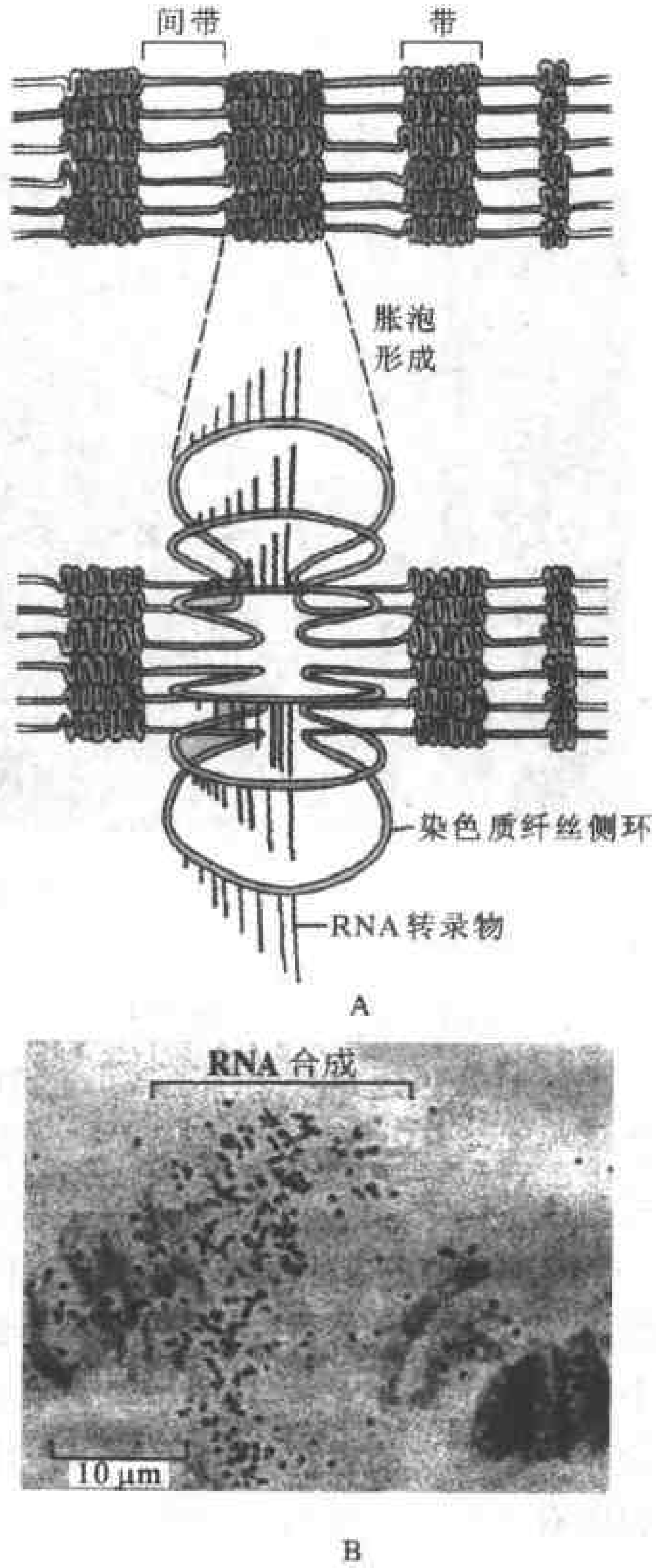


图 8-23　A：多线染色体胀泡形成示意图；B：单个胀泡的放射自显影，用$^{3}H-U$标记，表明活跃的 RNA 转录（引自 B. Alberts）

（二）灯刷染色体

灯刷染色体在 1882 年由 W. Flemming 在研究美西螈卵巢切片时首次报道，但由于其形态特殊而未能肯定。1892 年，Rukert 研究鲨鱼卵母细胞时，给灯刷染色体以正式命名。现已知道，灯刷染色体几乎普遍存在于动物界的卵母细胞

中，其中两栖类卵母细胞的灯刷染色体最典型，也研究得最深入(图 8-24)。在植物界，也有灯刷染色体的报道，如垂花葱(*Allium cernruum*)和玉米雄性配子减数分裂中出现不很典型的灯刷染色体，而大型的单细胞藻类地中海伞藻(*Acetabularia mediterranea*)却有典型的灯刷染色体。

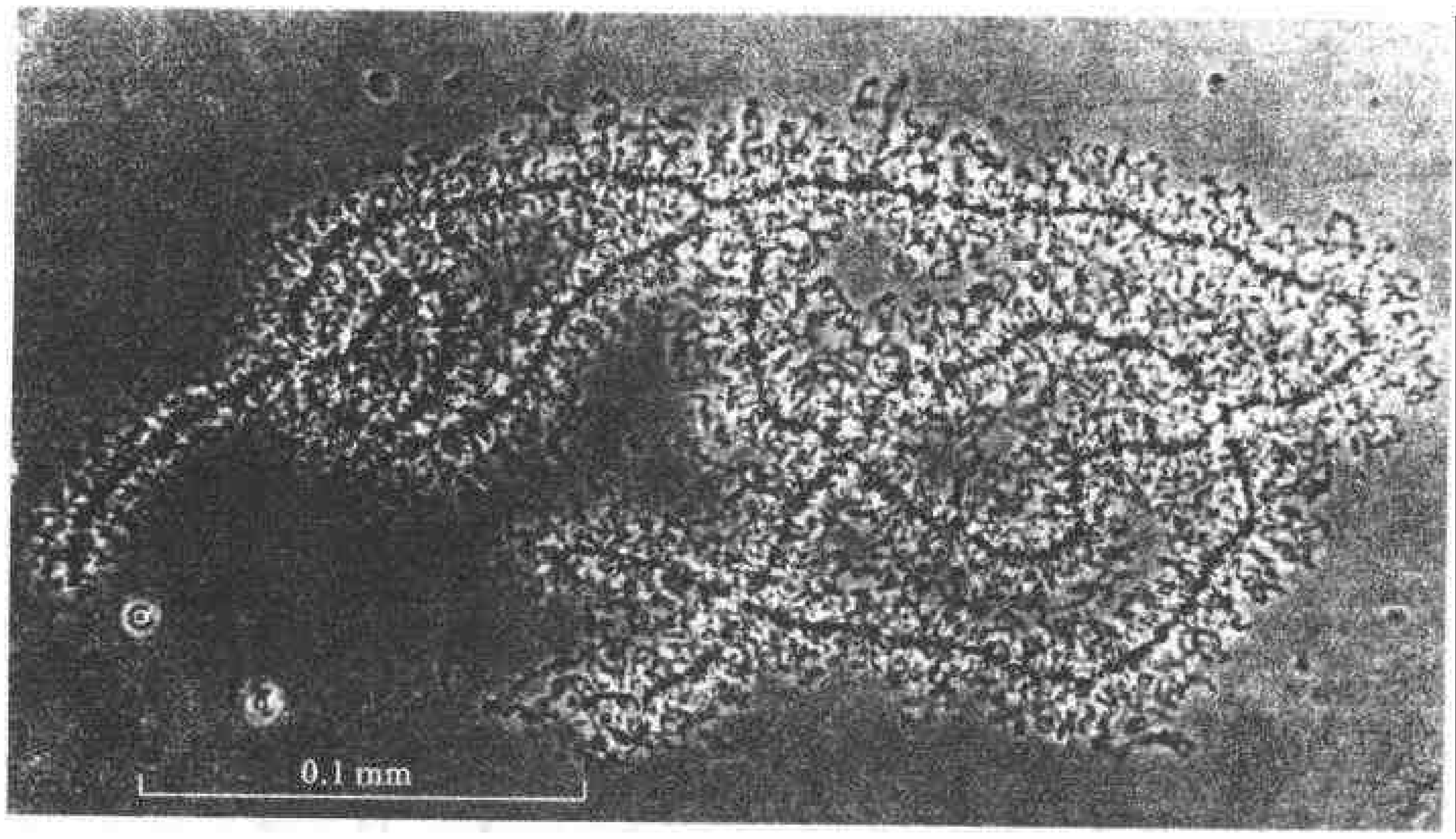


图 8-24　两栖类卵母细胞中的一个灯刷染色体(引自 J.G.Gall)

1. 灯刷染色体的超微结构

灯刷染色体是卵母细胞进行减数第一次分裂时停留在双线期的染色体，它是一个二价体，包含 4 条染色单体，此时同源染色体尚未完全解除联会，因此可见到几处交叉。这一状态在卵母细胞中可维持数月或数年之久。

灯刷染色体轴由染色粒轴丝构成，每条染色体轴长约 400 μm(多数有丝分裂染色体<10 μm)。从染色粒向两侧伸出两个相类似的侧环，每个环相当于一个环状结构域，一个平均大小的环约含 100 kb DNA。两栖类一套灯刷染色体约含一万个这样的染色质侧环，不同的侧环有各自的特异 DNA 序列，每个环在细胞中有 4 个拷贝(图 8-25)。

2. 灯刷染色体的转录功能

灯刷染色体的形态与卵子发生过程中营养物储备是密切相关的。大部分 DNA 以染色粒形式存在，没有转录活性，而侧环是 RNA 活跃转录的区域，一个侧环往往是一个大的转录单位或几个转录单位组合构成的。转录的 RNA 副本 3′端借助 RNA 聚合酶固定在侧环染色质轴丝上，游离的 5′端捕获大量蛋白质形成核糖核蛋白复合物，组成环周围的基质，环的粗细变化表示基质的厚薄和转录 RNA 的长短。转录起始点 RNA 短，随着 RNA 聚合酶读码而逐渐延长。用 RNase 和蛋白酶可将基质消化，侧环轴丝保留，改用 DNase 消化，侧环轴丝解体消失，说明基质由 RNP 组成，轴丝由 DNA 组成。灯刷染色体合成的 RNA 主要

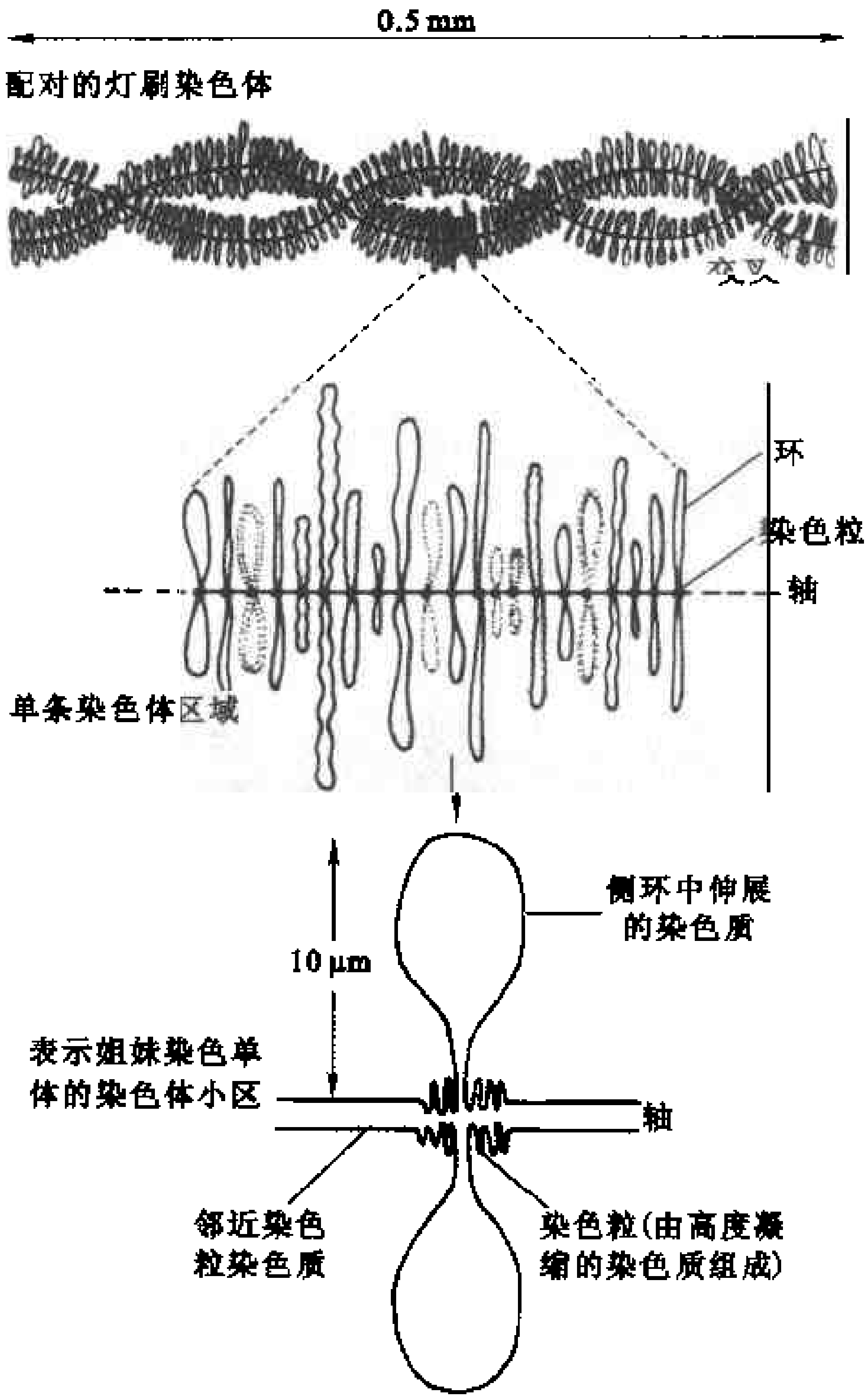


图 8－25　灯刷染色体结构图解(引自 B. Alberts)

为前体 mRNA(hnRNA),有些类型的 mRNA 可翻译成蛋白质,有些 mRNA 与蛋白质结合,暂不翻译而储存在卵母细胞中。

第四节　核　仁

核仁(nucleolus)是真核细胞间期核中最显著的结构。在光镜下被染色的细胞、相差显微镜下的活细胞或分离细胞的细胞核都容易看到核仁,它们通常表现为单一或多个匀质的球形小体。核仁的大小、形状和数目随生物的种类、细胞类型和细胞代谢状态而变化。蛋白质合成旺盛、活跃生长的细胞如分泌细胞、卵母细胞,其核仁大,可占总核体积的 25%,不具蛋白质合成能力的细胞如肌肉细胞、休眠的植物细胞,其核仁很小。在细胞周期过程中,核仁又是一个高度动态的结构,在有丝分裂期间表现出周期性的消失与重建。

真核细胞的核仁具有重要功能，它是 rRNA 合成、加工和核糖体亚单位的装配场所。因此对核仁结构、动态和功能的研究，不仅为早期细胞学家所密切注意，而几自 20 世纪 60 年代发现核仁重要功能以后，也一直受到各相关领域研究者的高度重视。

一、核仁的超微结构

电镜下核仁的超微结构与胞质中的大多数细胞器不同，它没有被膜包裹。尽管核仁的大小、形态和超微结构明显地随所研究的细胞类型和细胞的代谢状态而变化，但三种基本的核仁结构组分仍可通过超薄切片的电镜观察加以识别（图 8－26）。

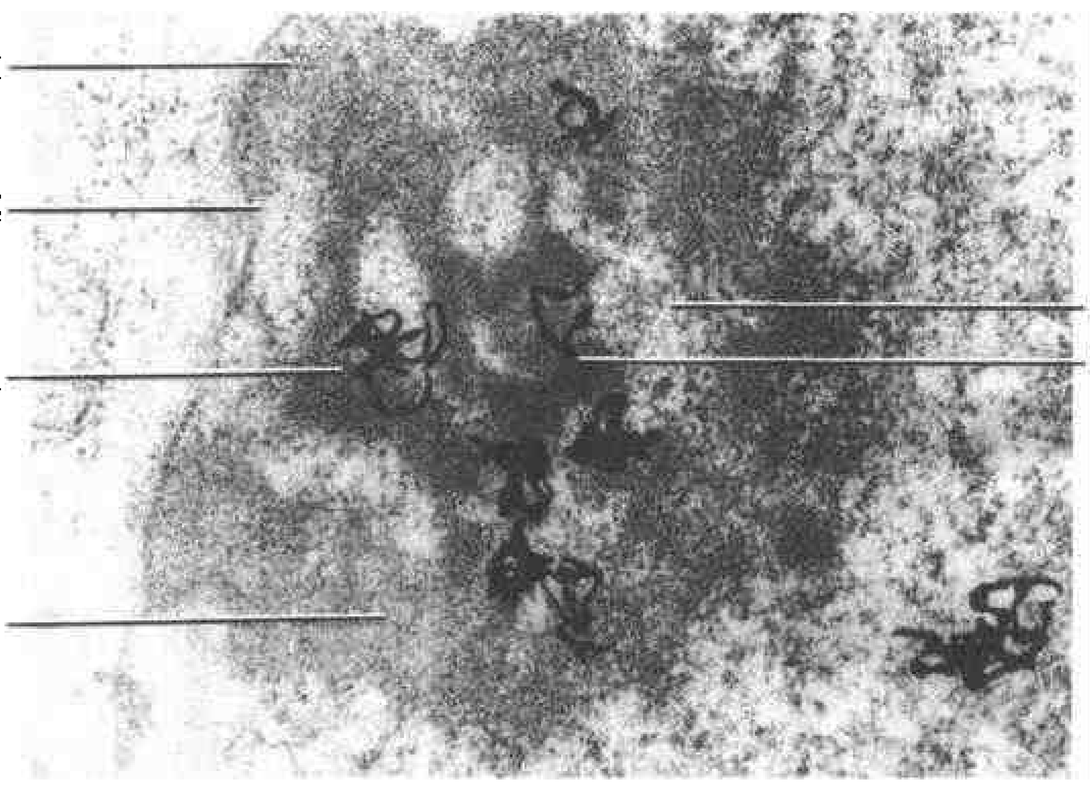


图 8－26　BHK－21 细胞核仁的电镜照片（丁明孝）
银颗粒示 rRNA 转录部位

1. 纤维中心

在电镜下观察，纤维中心（fibrillar centers，FC）是包埋在颗粒组分内部一个或几个浅染的低电子密度的圆形结构小岛，根据电镜细胞化学和放射自显影研究已经确证，在纤维中心存在 rDNA、RNA 聚合酶 Ⅰ 和结合的转录因子，并且光镜及电镜水平的原位分子杂交也证明了这种 DNA 具有 rRNA 基因（rDNA）的性质。根据形态相似性和嗜银蛋白的存在，通常认为 FC 代表染色体 NORs 在间期核的副本。然而由于核仁活性的变化，FC 的数目可能超过染色体 NORs 的数目。并且有证据表明，FC 中的染色质不形成核小体结构，也没有组蛋白存在，但存在嗜银蛋白，其中磷蛋白 C23 的存在已得到免疫电镜的证明，并认为它是和 rDNA 结合在一起的，可能与核仁中染色质结构的调节有关。

2. 致密纤维组分

在电镜下观察，致密纤维组分（dense fibrillar component，DFC）是核仁超微

结构中电子密度最高的部分。呈环形或半月形包围 FC,由致密的纤维构成,通常见不到颗粒。用$^{3}H-U$作为 RNA 前体物对细胞进行脉冲标记,根据电镜放射自显影观察,带放射性标记的第一个核仁结构就是 DFC,电镜原位分子杂交也证明 rRNA 以很高的密度出现在 DFC 区域。此外发现 DFC 还有特异性结合蛋白,其中比较清楚的是 fibrillarin、核仁素(nucleolin)和 Ag-NOR 蛋白。

3、颗粒组分

在代谢活跃的细胞的核仁中,颗粒组分(granular component,GC)是核仁的主要结构,由直径 15～20 nm 的核糖核蛋白(RNP)颗粒构成,可被蛋白酶和 RNase 消化,这些颗粒是正在加工、成熟的核糖体亚单位前体颗粒,间期核中核仁的大小差异主要是由颗粒组分数量的差异造成的。除上述三种基本核仁组分外,在电镜下观察超薄切片时会发现,核仁虽然没有膜包裹,但被或多或少的染色质所包围,这层染色质称为核仁相随染色质(nucleolar associated chromatin),有时还深入到核仁内,称为核仁内染色质(intranucleolar chromatin),而包围核仁的染色质称为核仁周边染色质(perinucleolar chromatin)。此外,应用 RNase 和 DNase 处理核仁,在电镜下看到核仁的残余结构,称为核仁基质(nucleolar matrix)或核仁骨架。FC、DFC 和 GC 三种组分都湮没在这种无定形的核仁基质中。

现有研究资料普遍认为,上述三种基本核仁组分以某种方式和 rRNA 的转录与加工形成 RNP 的不同事件有关。新近比较一致的看法认为,FCs 是 rRNA 基因的储存位点,转录主要发生在 FC 与 DFC 的交界处,初始 rRNA 转录物首先出现在 DFC 并在那里加工;某些加工步骤也发生在颗粒组分区(GC),并负责将 rRNA 与核糖体蛋白装配成核糖体亚单位,所以 GC 代表核糖体亚单位成熟和储存的位点。然而,关于 rRNA 基因转录的确切位点仍有不同见解。

二、核仁的功能

核仁的主要功能涉及核糖体的生物发生(ribosome biogenesis),这是一个向量过程(vetorical process),从核仁纤维组分开始,再向颗粒组分延续。这一过程包括 rRNA 的合成、加工和核糖体亚单位的装配。

(一) rRNA 基因转录的形态及组织特征

染色体原位分子杂交(*in situ* hybridization)证实 rRNA 基因(rDNA)定位于染色体的核仁组织区。用放射性标记的 rRNA 为探针与黑腹果蝇总 DNA 杂交,发现杂交程度与果蝇染色体 NORs 存在的数目正相关。在不含 NORs 的非洲爪蟾突变体中,不能合成 rRNA 及核糖体,也不能形成核仁。这些事实表明,位于 NORs 的 rDNA 是 rRNA 的信息来源(图 8-27)。

目前,纯粹用形态指标还不能识别原位固定的细胞核中的 rRNA 基因,若观察具有转录活性的 rRNA 基因,需要破坏核仁的整合结构,使 rRNA 基因从拓扑约束中释放出来。最初由Miller及其同事(1964)提出的染色质铺展技术,对于

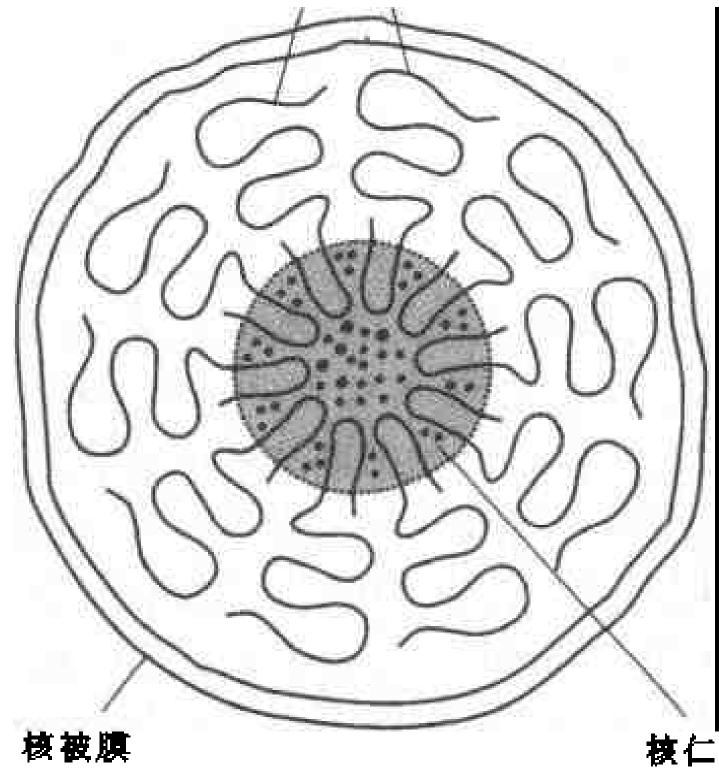


图 8-27　人间期细胞核仁组织区含有 rRNA 基因的 10 条染色质袢环延伸进入并簇集在核仁(引自 B.Alberts)

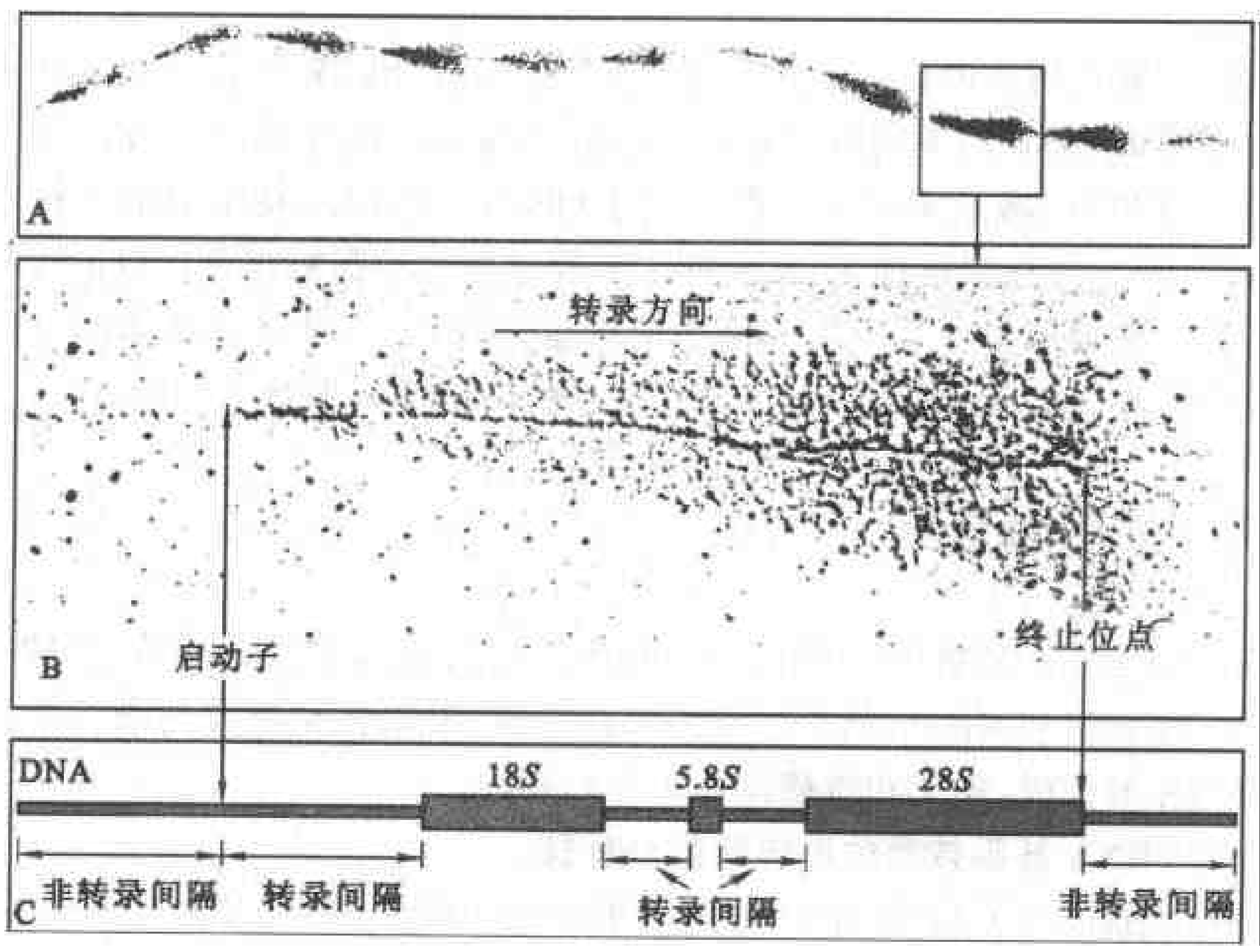


图 8-28　rRNA 基因串联重复排列，为非转录间隔所分开(引自 De Robertis)
A：一个 NOR 铺展的电镜标本，可见 11 个转录单位；B：一个 rDNA 转录单位的放大图；C：一个 rDNA 单位的基因图谱示意图

了解 rRNA 基因的组织、排列和染色质结构作出了重要贡献，使人们有可能在电镜标本上看到由 rRNA 基因转录成 rRNA 的形态学过程。根据在两栖类卵母细胞和其他细胞中具有转录活性的 rRNA 基因的电镜观察结果，发现 rRNA 基因

在染色质轴丝上呈串联重复排列;沿转录方向,新生的 rRNA 链逐渐增长,形成“圣诞树”样结构;转录产物的纤维游离端(5′端)首先形成 RNP 颗粒。这些形态特征是最直观的 rRNA 基因转录的证据(图 8－28)。

真核生物核糖体含有 4 种 rRNA,即 5.8*S* rRNA、18*S* rRNA、28*S* rRNA 及 5*S* rRNA,其中前三种的基因组成一个转录单位。与为蛋白质编码的 mRNA 不同,rRNA 分子是 rRNA 基因的最终产物,处于生长中的高等真核细胞一般都有 10^7 个核糖体以确保蛋白质合成机制的运转,这意味着每一细胞世代必须合成每一类型 rRNA 分子 10^7 拷贝,这需要相应增加基因“剂量”,并高度有效地转录。在真核细胞中,随物种的不同,有 100～5 000 个 rRNA 基因拷贝串联成重复序列,成簇分布在少数染色体 NORs 上。人单倍体基因组含有 200 个 rRNA 基因拷贝,成簇分布在 5 条不同的染色体上;爪蟾单倍体基因组含有 600 个 rRNA 基因拷贝,单一丛集在一条染色体上。这些 rRNA 基因是由专一性的 RNA 聚合酶Ⅰ进行转录的。一般情况下,这些 rRNA 基因拷贝数是不变的,因此调控主要依赖于转录起始的速率。这种成簇分布的串联重复排列的 rRNA 基因被组织在很小的核仁区域,一方面增加了启动子的局部浓度,另一方面串联重复基因本身就使得专一的 RNA 聚合酶Ⅰ在一个转录单位内进行连续运作,即在转录前一个基因之后并不解离而是活化第二个基因的转录。这种组织方式和高密度分布、专一性的 RNA 聚合酶Ⅰ,使 rRNA 基因的转录能够采取受控的级联放大机制。

(二) rRNA 前体的加工

每个 rRNA 基因转录单位由 RNA 聚合酶Ⅰ转录产生相同的初始转录产物 rRNA 前体,不同生物的 rRNA 前体大小不同,哺乳类为 45*S* rRNA(约 13 000 个核苷酸),果蝇为 38*S* rRNA,酵母为 37*S* rRNA。由于真核生物的 rRNA 加工过程比较缓慢,其中间产物可从各种细胞中分离出来,因此真核生物的 rRNA 加工过程比较清楚。用^{3}H－U 标记 HeLa 细胞的 RNA,则可通过凝胶电泳分离到 45*S* rRNA 前体以及 41*S*、32*S*、20*S* 等加工产物。通过标记动力学实验,证明它们是 rRNA 加工过程中的前体和中间物。它们的加工过程如图 8－29 所示。

在真核生物中,5*S* rRNA 基因(120 bp)不定位在 NORs,人约有 2 000 个 5*S* rRNA 基因,也是成簇串联排列的,中间同样间隔以不被转录的片段,由 RNA 聚合酶Ⅲ所转录,5*S* rRNA 转录后经适当加工即参与核糖体大亚单位的装配。

在核糖体生物发生过程中,rRNA 前体被广泛修饰与加工,涉及一系列的核酸降解切割以及碱基修饰,每个 rRNA 分子修饰产生 100 个左右 2′－*O*－甲基核糖和 90 个左右假尿嘧啶核苷残基。在 rRNA 成熟过程中,一类小分子核仁核糖核蛋白(small nucleolar ribonucleoproteins, snoRNPs)作为引导 RNA(guide RNA)参与 RNA 的编辑加工过程,其编辑的靶位点可能与那些被修饰的残基有关。

(三) 核糖体亚单位的装配

45*S* rRNA 前体转录以后很快与蛋白质结合,因此,rRNA 前体的加工过程

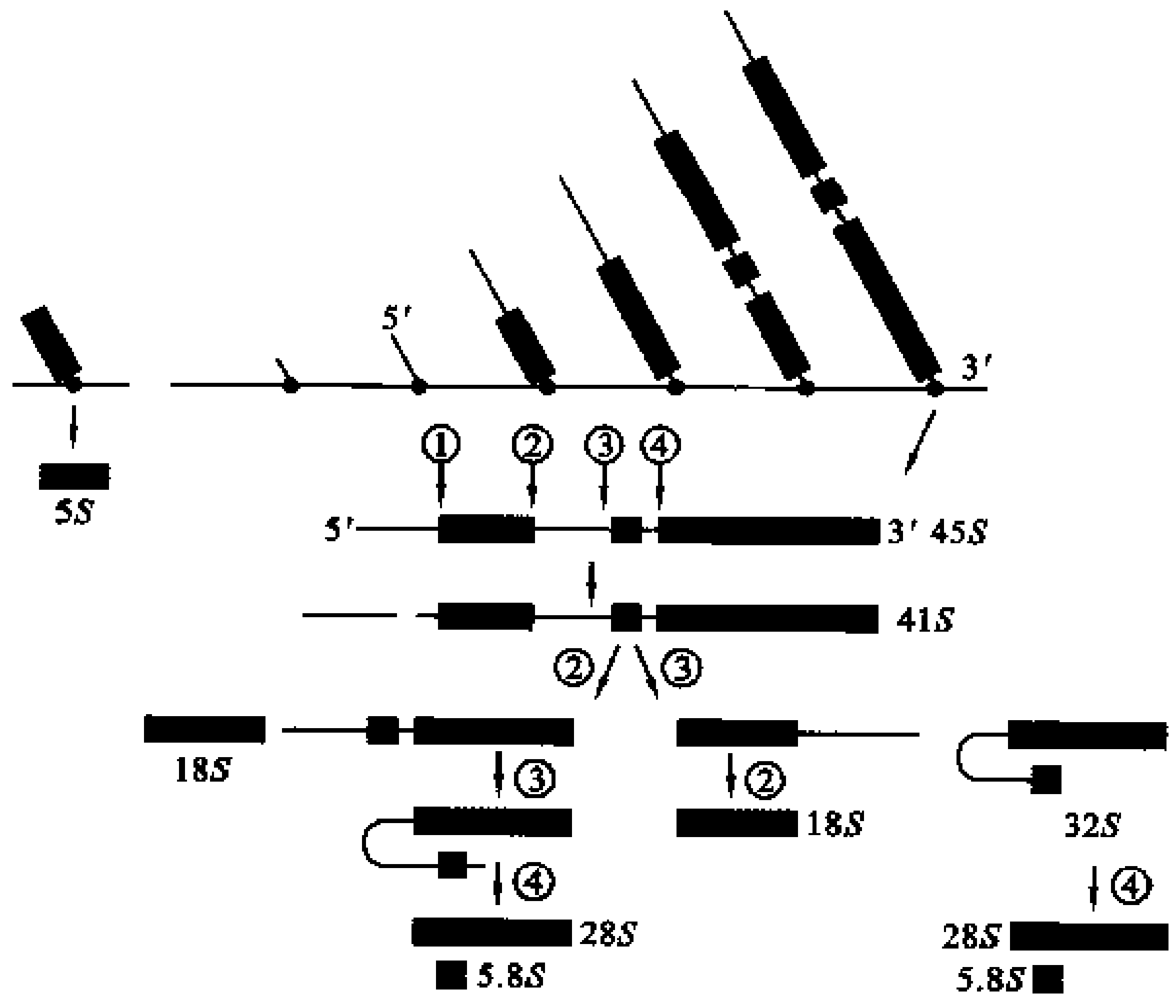


图 8-29　哺乳类 45S rRNA 前体的加工过程(引自 R.P.Perry,1981)

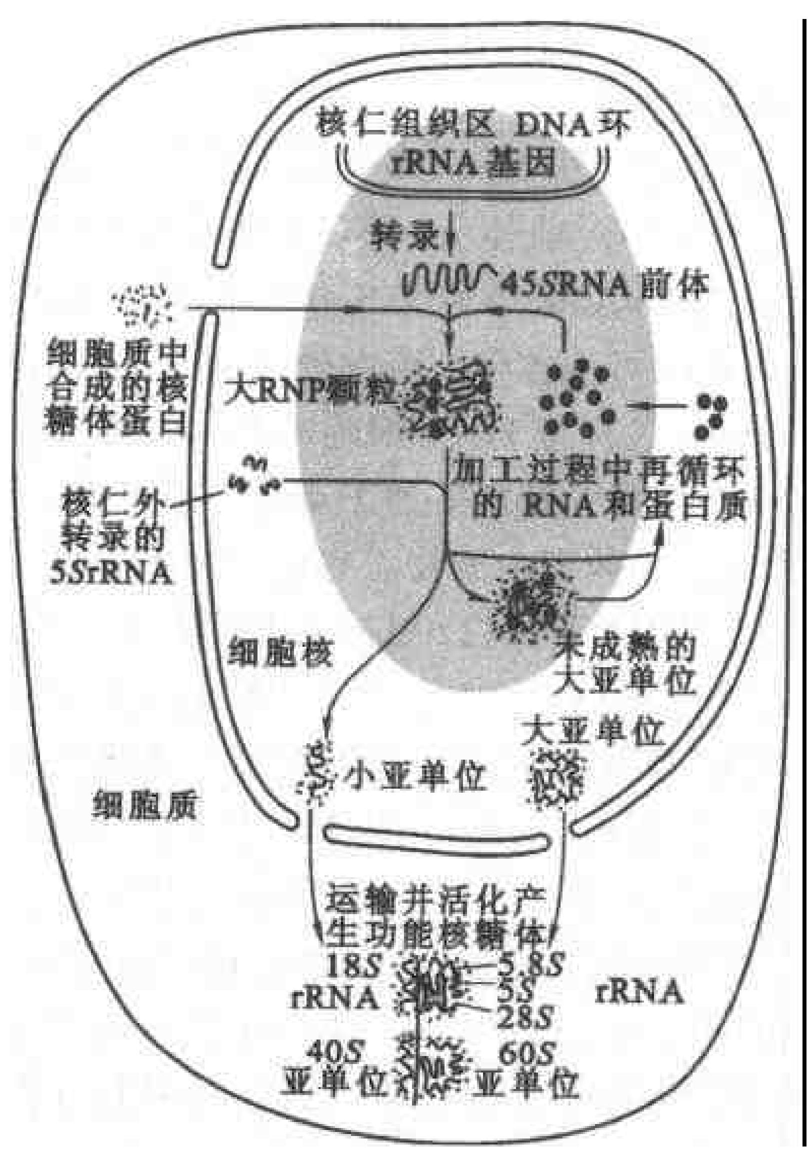


图 8-30　核仁在核糖体亚单位前体装配中的作用图解(引自 B.Alberts 等)

是以核蛋白而不是游离 rRNA 的方式进行的。根据带有放射性标记的核仁组分的分析,发现完整的 45*S* rRNA 前体首先与蛋白质结合被包装成 80*S* 的 RNP 复合体。在加工过程中,80*S* 的 RNP 再逐渐失去一些 RNA 和蛋白质,然后剪切形成两种大小不同的核糖体亚单位前体(图 8-30)。通过放射性脉冲标记和示踪实验表明,在 30 min 内,首先成熟的核糖体小亚单位(含有 18*S* rRNA)在核仁产生并很快出现在细胞质,而 28*S*、5.8*S* 和 5*S* rRNA 装配成核糖体大亚单位约需 1 h 完成,所以核仁含有的核糖体大亚单位比小亚单位多得多。加工下来的蛋白质和小的 RNA 存留在核仁中,可能起着催化核糖体构建的作用。

一般认为,核糖体的成熟作用只发生在它们的亚单位被转移到细胞质以后,因而有利于阻止有功能的核糖体与核内加工不完全的 hnRNA 分子接近。

核仁除上述 rRNA 的合成、加工和核糖体亚单位装配的主要功能之外,另一个功能涉及 mRNA 的输出与降解。最初的观察发现,哺乳类细胞通过紫外线照射灭活核仁,可阻止非核糖体 RNA 的输出。虽然在高等真核细胞大量 poly(A) RNA 并不定位于核仁,但是一些特殊的 mRNA(如 MyoD、N-myc 的转录物)已在核仁中检测到。进而在酵母中发现,*mtr*1-1 和 *mtr*2-1 基因突变或重度热休克(severe heat shock)会干扰 mRNA 的运输,结果导致 poly(A)RNA 在核仁中的积累。

三、核仁周期

在细胞周期中,核仁是一种高度动态的结构,在形态和功能上都发生很大的变化。当细胞进入有丝分裂时,核仁首先变形和变小,然后随着染色质凝集,核仁消失,所有 RNA 合成停止,致使在中期和后期细胞中没有核仁;在有丝分裂末期,rRNA 合成重新开始,核仁的重建随着核仁物质聚集成分散的前核仁体(prenucleolar body,PNBs)而开始,然后在 NORs 周围融合成正在发育的核仁。

在细胞周期中核仁周期(nucleolar cycle)性变化的分子过程还不十分清楚,但近几年来的研究表明,核仁的动态变化是 rDNA 转录和细胞周期依赖性的。在细胞周期的间期,核仁结构整合性(structure integrity)的维持,以及有丝分裂后核仁结构的重新建成,都需要 rRNA 基因的活性。用带有荧光标记的 RNA 聚合酶 Ⅰ 抗体显微注射到体外培养的 PtK2 细胞核中,rRNA 基因的转录被选择性抑制,通过双标记免疫荧光显微术(double label immunofluorescence microscopy)和电镜观察发现,注射 RNA 聚合酶 Ⅰ 抗体后,DFC 很快开始去整合并导致核仁解体,核质内充满大量核仁外体(extra nucleolar body),用 fibrillarin 抗体染色证明,这些核仁外体具有 DFC 性质,残余的核仁失去 DFC,主要由 FC 和 GC 组成。由此可见,DFC 在核仁中的定位与整合,关键依赖于正在转录的 rRNA 基因。

采用上述相同的方法,将 RNA 聚合酶 Ⅰ 抗体注射到有丝分裂中期的细胞内,被注射的细胞虽然能继续完成分裂并且子细胞按正常周期运转进入 G_1 期,

但它们却不能重建核仁，而是在核中充满许多 PNBs。PNBs 含有 fibrillarin 及其他核仁蛋白，但没有 RNA 聚合酶 Ⅰ 和拓扑异构酶 Ⅰ，也没有 rDNA。结果表明，预先形成的 PNBs 围绕染色体 NORs 重建核仁，同样需要 RNA 聚合酶 Ⅰ 的活性，rRNA 基因转录的抑制是阻止核仁重建的早期步骤。

第五节　染色质结构和基因转录

按功能状态的不同可将染色质分为活性染色质(active chromatin)和非活性染色质(inactive chromatin)。对绝大多数细胞而言，在特定阶段具有转录活性的基因只占基因总数的 10% 以下，而 90% 以上的基因在转录上是不活跃的。所谓活性染色质是指具有转录活性的染色质；非活性染色质是指没有转录活性的染色质。

活性染色质由于核小体构型发生构象改变，往往具有疏松的染色质结构，从而便于转录调控因子与顺式调控元件结合和 RNA 聚合酶在转录模板上滑动。当染色质结构处于疏松状态时，利用核心组蛋白 H3 暴露出来的游离巯基与有机汞的亲和性，可采用有机汞亲和层析和二硫苏糖醇(DTT)洗脱的方法将活性染色质分离出来。

一、活性染色质的主要特征

(一) 活性染色质具有 DNase Ⅰ 超敏感位点

当染色质用 DNase Ⅰ 消化时，可将染色质降解成酸溶性的 DNA 小片段。若从鸡红细胞中提取染色质进行上述处理，发现 β 珠蛋白基因很快就被降解，而卵清蛋白基因的降解程度则很低。相反，若从鸡输卵管细胞中提取染色质作同样处理，则优先降解的是卵清蛋白基因而不是 β 珠蛋白基因。结果表明，凡有基因表达活性的染色质 DNA，对 DNase Ⅰ 的降解作用比没有转录活性的染色质 DNA 要敏感得多。进一步发现，正在转录或具有潜在转录活性而未转录的基因对 DNase Ⅰ 同样敏感，说明活化染色质对 DNase Ⅰ 的优先敏感性(preferential sensitivity)不是由于转录过程中 RNA 聚合酶的作用，而是可转录染色质的一个基本特征。用 DNase Ⅰ 处理染色质时，优先释放出两种高迁移组分(high mobility group)非组蛋白，它们是 HMG14 和 HMG17。当把这两种非组蛋白从鸡红细胞染色质中用低盐溶液抽提出来以后，珠蛋白基因就不再表现出对 DNase Ⅰ 的优先敏感性，而在盐抽提过的染色质中加入这两种非组蛋白后，敏感性又可恢复，说明活化染色质对 DNase Ⅰ 的优先敏感性与这两种非组蛋白有关。然而，把这两种蛋白加入盐抽提过的鸡脑细胞染色质后，其中的珠蛋白基因并不表现出对 DNase Ⅰ 的优先敏感性，说明这些 HMG 蛋白质又不是造成这种优先敏感性的惟一原因。红细胞和脑细胞中一定还存在其他因子的差异，这些因子决定了红细胞的珠蛋白基因在 HMG14 和 HMG17 存在时对 DNase Ⅰ 敏感。

如用很低浓度的 DNase I 处理染色质，切割将首先发生在少数特异性位点上，这些特异性位点叫做 DNase I 超敏感位点（DNase I hypersensitive site）。超敏感位点的存在是活性染色质的特点。若用游离 DNA 作底物则无超敏感位点出现。通过对大量基因进行的试验发现，每个活跃表达的基因都有一个或几个超敏感位点，大部分位于基因 5′端启动子区域，少部分位于其他部位，如转录单位的下游。并且发现，5′端超敏感位点只出现在基因正在活跃表达的细胞中，而该基因不表达的细胞中则不存在。例如，对于鸡 β 珠蛋白基因簇，胚胎阶段超敏感位点出现在胚胎型基因而不是成体型基因的 5′端；而在成体阶段情况则恰好相反，超敏感位点出现在成体型而不是胚胎型 β 珠蛋白基因的 5′端。这说明超敏感位点和基因活性有一定的关系。现已知道，超敏感位点实际上是一段长 100～200 bp 的 DNA 序列特异暴露的染色质区域。由超敏感位点所代表的染色质结构变化，可能在于超敏感序列首先与其他蛋白质结合而阻止核小体的装配。这样，该序列不被组蛋白八聚体所保护，所以一个典型的超敏感位点区对核酸酶攻击的敏感性是其他染色质区域的 100 倍以上。活性基因的超敏感位点建立在启动子附近，并与启动子功能有关，很可能是为 RNA 聚合酶、转录因子或其他蛋白调控因子提供结合位点。现有证据表明 5′端超敏感位点的建立发生在转录起始之前，但很可能是起始转录的必要条件而非充分条件。有人为说明超敏感位点的稳定性，用温度敏感的肿瘤病毒转化导致珠蛋白基因的激活，并建立超敏感位点；如果转化在非许可的较高温度下完成，则珠蛋白基因不被激活，也不出现超敏感位点；在低温下珠蛋白基因被转化激活后，若提高温度可使其失活而不表达，但已建立的超敏感位点却至少要保持到细胞复制 20 次以后。这一结果也证实了超敏感位点的建立只是起始转录所必要的特征之一，但建立超敏感位点的事件与保持该位点的事件可能是不同的。

（二）活性染色质在生化上具有特殊性

根据对活性染色质蛋白组分的生化分析发现：①活性染色质很少有组蛋白 H1 与其结合；②活性染色质的 4 种核心组蛋白虽然以常量存在，但是与非活性染色质相比较，活性染色质上的组蛋白乙酰化程度高；③与非活性染色质相比，活性染色质的核小体组蛋白 H2B，很少被磷酸化；④核小体组蛋白 H2A 在许多物种包括果蝇和人的活性染色质中很少有变异的形式存在；⑤HMG 蛋白（high mobility group proteins）是染色体非组蛋白中一组较丰富、不均一、富含电荷的蛋白质。其中 HMG14 和 HMG17 只存在于活性染色质中，与 DNA 结合。平均每 10 个核小体中有 1 个核小体是与 HMG 14 和 HMG17 结合的，其氨基酸序列在进化中高度保守，表明它们有重要功能。

二、染色质结构与基因转录

真核生物核内 DNA 盘绕组蛋白核心形成核小体，而不以裸露状态存在。随着 20 世纪 70 年代核小体结构的发现，提出了一个迄今尚无满意答案的重要

问题，那就是 RNA 聚合酶与转录因子这类非组蛋白如何能与同组蛋白核心紧密结合的 DNA 相互作用？实际上，大量证据似乎表明 DNA 与核小体的结合，阻断了 DNA 与转录因子和基础转录装置的接近，从而阻断了转录的进行。但同时，又有些证据表明，DNA 在与组蛋白形成复合物的情况下仍可被转录。当前研究染色质结构的改变与基因活化的关系主要集中在如下三个方面：一是如何形成活性染色质中的超敏感位点以便 RNA 聚合酶能起始转录；二是具有转录活性的染色质结构域如何与周围的非活性区域隔离；三是 RNA 聚合酶如何通过与组蛋白结合的 DNA 模板进行转录。

（一）疏松染色质结构的形成

染色质的疏松状态源于核小体的松散或缺失，根据核小体结构与功能的关系，可能有以下原因引起核小体的松散或缺失：

1. DNA 局部结构的改变与核小体相位的影响

和细胞其他部分一样，染色质并不是一个静止的结构，而是一个活泼、动态、可塑的蛋白质与核酸组成的复合体。当一个调控蛋白结合到染色质 DNA 的一个特定的位点上时，不管是在核小体间还是在一个核小体内，染色质很容易被引发二级结构的改变。这些改变随后引起其他的一些结合位点与调控蛋白的结合或者更加容易或者更加困难。有证据表明，结合到 DNA 上的基因调控蛋白在相当远的地方都能发生其影响。比如，某一特定的转录因子结合到一个离某基因较远的增强子序列上，则有利于在该基因较近的 TATA 框序列上进行前起始复合体的装配。该复合体一旦装配后，就可以作为转录因子与其他调控位点结合的“靶”，结果使染色质上某一特定区域从转录非活化状态转变成转录活化状态。似乎细胞具有某些“工具”能撬开被核小体阻断的 DNA 区域，以便允许转录因子与 DNA 接触。例如酵母和人类细胞具有一种多亚基复合物 SWI/SNF，利用 ATP 水解释放的能量破坏组蛋白与 DNA 之间的相互作用，使转录因子得以同基因调控区结合。此外，不同的拓扑异构酶能调整 DNA 双螺旋的局部构象和高级结构的变化，使之超螺旋或松弛。实验发现拓扑异构酶Ⅱ抑制果蝇 *hsp* 基因的转录；拓扑异构酶Ⅰ分布于

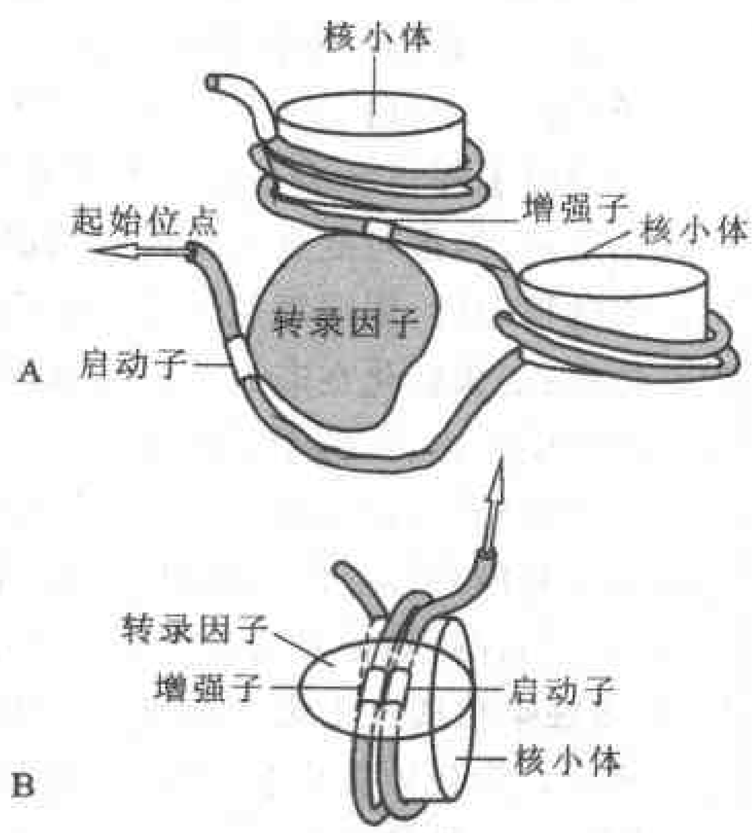


图 8－31 核小体相位在协助转录中的作用

A：基因的关键调控元件被留在核心颗粒外面，从而有利于结合转录因子

B：位于 DNA 上的调控元件被盘绕在核心组蛋白上，因为组蛋白使 DNA 上的关键调控元件靠得很近，它们可以通过转录因子而联系

果蝇多线染色体中具转录活性的基因座;B 型 DNA(右旋)变成 Z 型 DNA(左旋),会导致核心组蛋白八聚体与 DNA 的亲和力降低。核小体并非沿 DNA 随机分布,而是通常定位在特殊位点,一种情况是基因关键调控元件(增强子和启动子)位于核小体颗粒之外,使之便于与转录因子结合(图 8-31A);另一种情况是基因调控元件位于盘绕核心组蛋白的 DNA 上,则增强子和启动子两种调控元件通过转录因子被联系起来(图 8-31B)。

2. 组蛋白的修饰

组成核小体的组蛋白八聚体的 N 端都暴露在核小体之外,某些特殊的氨基酸残基会发生乙酰基化、甲基化、磷酸化或 ADP 核糖基化等修饰。这些基团修饰的意义,一是改变染色质的结构,直接影响转录活性;二是核小体表面发生改变,使其他调控蛋白易于和染色质相互接触,间接影响转录活性。

(1) 核心组蛋白的赖氨酸残基乙酰基化(acetylation)

组蛋白的赖氨酸残基乙酰基化是核小体重建的一种重要方式。乙酰基化后的组蛋白赖氨酸侧链不再带有正电荷,这样就失去了与 DNA 紧密结合的能力,使相邻核小体的聚合受阻,同时影响泛素与组蛋白 H2A 的结合,导致蛋白质的选择性降解。组蛋白 H3 和 H4 是蛋白酶修饰的主要位点,它们的乙酰基化可能有类似促旋酶(gyrase)的活性,使核小体间的 DNA 因产生过多的负超螺旋易于从核小体上脱离,致使对核酸酶敏感性增高,并有利于转录调控因子的结合。人们早就发现,增加赖氨酸的甲基化程度与转录水平的提高有关联,但近年来负责组蛋白乙酰基化的酶才被鉴定,并分析了这些酶的性质。同样,近年来还发现大量的辅激活子(coactivator)具有组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase)的功能,将乙酰基从乙酰 CoA 供体转移到组蛋白特异的赖氨酸残基上。辅激活子作为一种接头蛋白,在 DNA 上游位点将转录因子同基础转录装置连接起来。通过具有组蛋白乙酰基转移酶活性的辅激活子的作用,特定的启动子可被看作是核小体解体的起始靶。由许多激素受体所介导的基因转录可以说明这一途径。激素受体和辅激活子(CBP)结合,CBP 具有组蛋白乙酰基转移酶的活性,当这些受体与 DNA 上相应的激素应答元件(hormone response elements)结合时,同时与 CBP 辅激活子相互作用,CBP 辅激活子转而使位于核心启动子区的核小体的组蛋白侧链乙酰基化,进而组蛋白乙酰基化打开启动子并促使转录装置的装配,从而导致相关基因的转录(图 8-32)。

染色质的乙酰基化状态是一种动态过程,既有使组蛋白乙酰基化的酶,也有使组蛋白去乙酰基化的酶(histone deacetylase)。组蛋白去乙酰基化伴随着对转录的阻抑,实际上有许多转录辅阻抑物(transcriptional co-repressor)作为组蛋白去乙酰化酶而发挥作用。通过比较活性 X 染色体(Xa)与失活 X 染色体(Xi),我们可以发现:雌性哺乳动物中失活的 X 染色体上的 H4 组蛋白不发生乙酰基化,而雄性中有活性的 X 染色体上的 H4 都是乙酰基化的,前者不表达,后者表达;雌性哺乳动物中 Xa 和 Xi 的情况亦然,有活性的 X 染色体含有乙酰基化的组蛋白,而失活的X染色体其组蛋白则没有乙酰基化修饰。用乙酰基化H4的

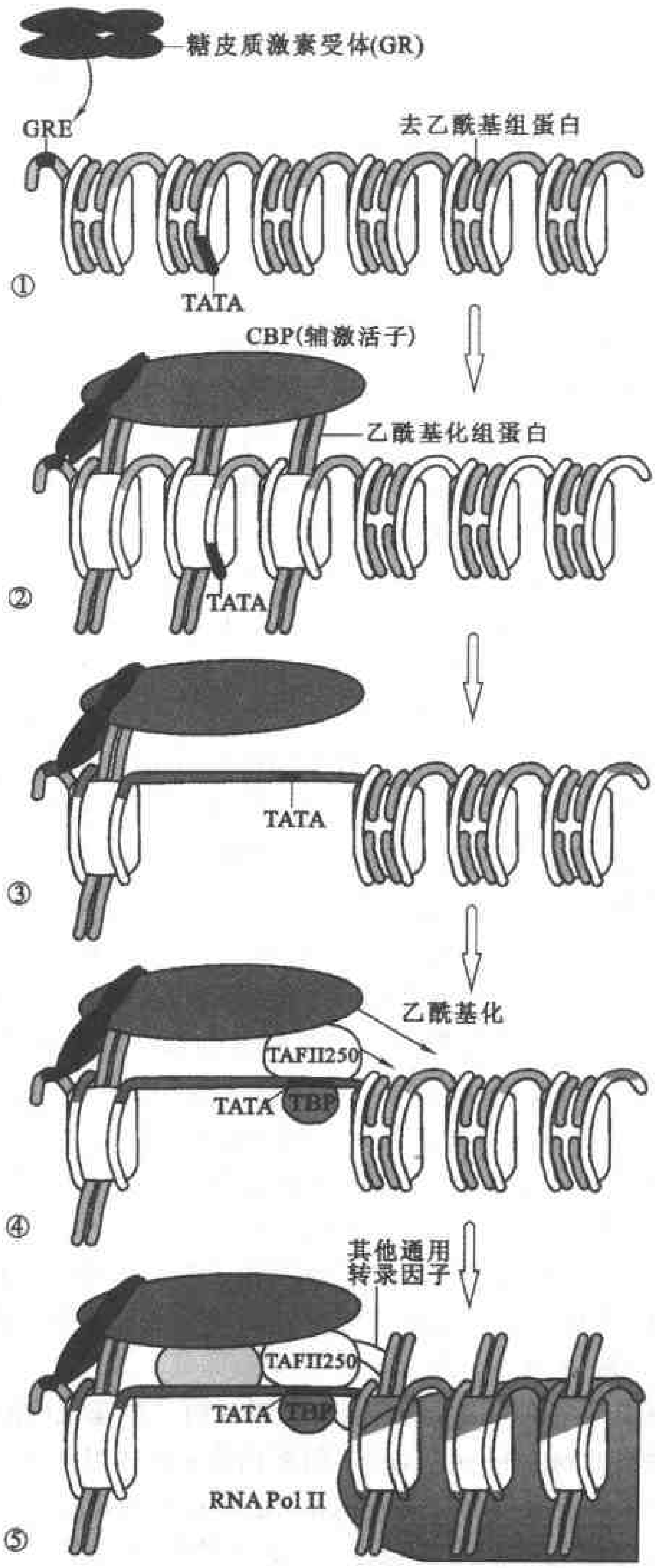


图 8－32　辅激活子通过组蛋白乙酰基化在转录调控中作用的模型

转录因子（如糖皮质激素受体，GR）与 DNA 结合并捕获辅激活子（CBP）；CBP 具有组蛋白乙酰基转移酶活性；①表示一段阻抑状态的染色体区域，其 DNA 与去乙酰基组蛋白结合；②糖皮质激素受体（GR）和糖皮质激素应答元件（GRE）结合，辅激活子 CBP 同 GR 结合，处于 TATA 框的上游和下游的核心组蛋白被乙酰基化；③被乙酰基化的组蛋白与 DNA 分离；④TFⅡD 与 DNA 的开放区结合。TAFⅡ250 是 TFⅡD 的一个亚基，具有组蛋白乙酰基转移酶活性；同时，CBP 和 TAFⅡ250 又解离相邻的核小体，以便容许转录起始；⑤在启动子区剩下的核小体也被乙酰基化，RNA 聚合酶与启动子结合，转录开始

抗体标记人和小鼠的中期染色体，除 Xi 外，其他染色体都被标记，所以中期染色体上 H4 乙酰基化程度的高低，可代表基因转录活性的高低。有人估计，H2B、H3、H4 可能具有 32 种不同的乙酰基化方式，而每种乙酰基化方式都可能使核小体结构发生改变，或使核小体上供结合蛋白识别的表面发生变化，从而对转录起始复合体的装配起不同的作用。

（2）组蛋白 H1 的磷酸化

组蛋白 H1 丝氨酸残基的磷酸化主要发生在有丝分裂期。分裂后，其磷酸化下降到峰值的 20%。由于 H1 对核小体起装配作用，确定核小体的方向，并对 30 nm 的螺线管起维持稳定的作用，因此，H1 磷酸化必然导致对 DNA 亲和力下降，造成染色质疏松，直接影响染色质的活性。此外 H4 组蛋白 N 端有特殊的氨基酸残基可与基因特异的激活因子相互作用，当发生氨基酸置换或删除时，便会改变特定基因的核小体相位。H3 组蛋白 C 端结构域中的 105 和 118 位氨基酸残基正好处于它结合核小体二重对称轴（dyad axis）上的 DNA 与另一个 H3 组蛋白相连的位置，如果发生突变，便会影响蛋白质与蛋白质、蛋白质与 DNA 间的接触，使核小体不稳定，并可能导致 H2A/H2B 以及 H1 从核小体上解离。

3．HMG 结构域蛋白的影响

高速泳动的非组蛋白 HMG1 和 HMG2 有 A、B 和 C 三个结构域，A、B 结构相似，C 含有酸性的羧基端尾部，与 H1 结合。最近发现 RNA 聚合酶 I 系统的转录因子 UBF 的 DNA 结合单元是 85 个氨基酸残基的重复区，与 HMG1 和 MHG2 的 A、B 结构相似，于是将这种特征性结构命名为“HMG”结构域。与这一结构域相应的 DNA 序列称为“HMG box”，而具有一个或多个 HMG 结构域的蛋白质称为 HMG 结构域蛋白。HMG 结构域蛋白有细胞特异性，根据结构域拷贝数，序列识别特性和进化关系等分为两个亚簇，一个亚簇广泛存在于各种细胞中，如 HMG1 和 MHG2，UBF（RNA 聚合酶 I 的转录因子）一般有多个 HMG 结构域，没有 DNA 识别特异性，执行不同的功能。另一个亚簇只存在于特定的细胞中，能识别特异的 DNA 序列，只有一个 HMG 结构域，如淋巴细胞增强子结合因子 LEF－1、TCF－1 和 SRY。HMG 结构域蛋白结合在 DNA 双螺旋的小沟中，以 40 倍的优势选择富含嘧啶的核苷酸元件。HMG 结构域蛋白的功能之一是与 DNA 弯折和 DNA－蛋白质复合体高级结构的形成有关。研究发现，HMG 结构域可识别某些异型的 DNA 结构，可使 DNA 链产生 90°～130°的弯折。一般来说，小于 150 bp 的 DNA 双链很难自发形成环状结构，但在非特异的 HMG1 存在时，可改变 DNA 双螺旋结构，形成 66 bp 的 DNA 环。具转录活性的核小体常缺乏 H1，但有非组蛋白 HMG 14、HMG 17 存在，在爪蟾中发现 HMG 17 会促进 RNA 聚合酶Ⅲ的转录，HMG 14 则直接参与 RNA 聚合酶Ⅱ对染色质中基因的转录等。

（二）染色质的区间性

1．基因座控制区

基因座控制区（locus control region，LCR）是染色体 DNA 上一种顺式作用元

件，其结构域中含有多种反式作用因子的结合序列，可能参与蛋白质因子的协同作用，使启动子处于无组蛋白状态，即 LCR 具有稳定染色质疏松结构的功能；另外多种反式作用因子的结合序列可保证 DNA 复制时与启动子结合的因子仍然保持在原来的位置上。不同的 LCR 可通过特异结合因子的导向结合在相关基因的启动子上，使相关基因或基因簇在基因组中表达增强。在转基因动物中，带有 LCR 结构域的基因都能高效表达，Felsenfeld(1996)等，用 DNA 重组技术证明鼠 LCR 是很强的增强子。

2. 隔离子

基因表达有位置效应，有的活性基因变位到异染色质区附近时会失活。能防止处于阻抑状态与活化状态的染色质结构域之间的结构特点向两侧扩展的染色质 DNA 序列，称为隔离子(insulator)。研究表明，隔离子可能有下列作用：一是作为异染色质定向形成的起始位点；二是作为结构域两端的锚定点，提供拓扑隔离区，使结构域外的增强子成分不能进入；三是涉及追踪机制，远端增强子处组成的复合体沿染色质模板运动直到启动子，而隔离子可使这个复合体越轨。虽然三种作用模式均不能满意地解释所有观察到的隔离子现象，但却有可能证明隔离子是以不同方式行使功能的。果蝇中 SCS(specialized chromosome structure)是一段 250～300 bp的 DNA 序列，插入启动子与增强子之间可阻断来自增强子的转录激活作用。如当小白眼报告基因整合进果蝇基因组时，这个基因可免于产生位置效应。

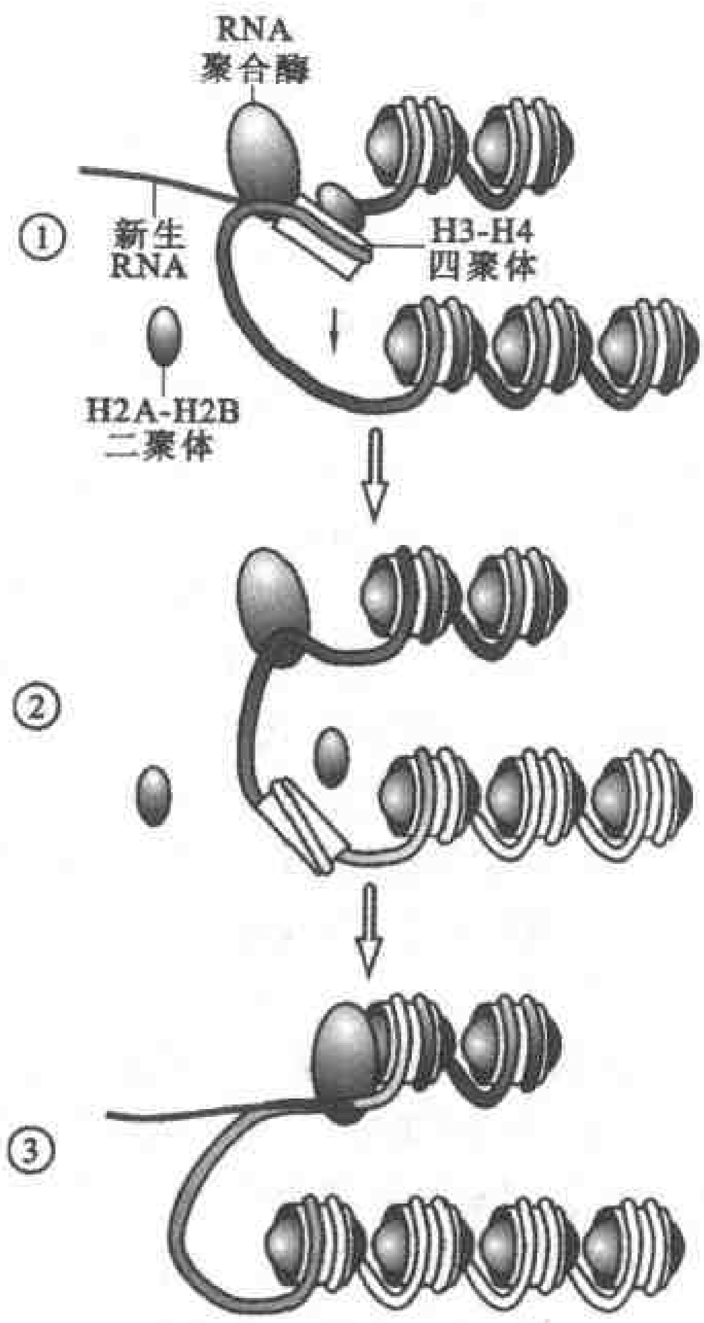


图 8－33　通过核小体核心结构的转录的模型(引自 C.C.Adams 等)

① RNA 聚合酶使核小体不稳定，撤掉 2 个(H2A－H2B)，形成 H3－H4 四聚体复合物

② 组蛋白核心的另一半(H3－H4 四聚体)被移开并转到聚合酶后面的自由 DNA 上

③ 2 个 H2A－H2B 二聚体重新结合到 DNA 上，又形成一个完整的核小体核心结构

（三）染色质模板的转录

真核细胞中基因转录的模板是染色质而不是裸露的 DNA，因此染色质呈疏松或紧密结构，即是否处于活化状态是决定 RNA 聚合酶能否有效行使转录功能的关键。现在普遍认为，转录起始伴随着染色质上的一基因调节序列内部或者周围的结构改变。某些情况下，如在两栖类卵子发生过程中，rRNA 基因

进行活跃地转录时,染色质 DNA 似乎没有核小体。不过,研究大多数转录基因发现,仍然保留了它们的核小体,即使有 RNA 聚合酶沿着 DNA 运动也是如此。RNA 聚合酶是一个大分子,差不多有两个核小体那么大,它和大约 50 bp DNA 结合,而且还不能有损伤。因此 DNA 模板不太可能牢固地结合在未解开的核小体的核心结构上而被转录。RNA 聚合酶被认为是用"核小体犁"(nucleosome plow)(如前面提到的 SWI/SNF 复合物)来克服这一障碍的,即用"核小体犁"来解除组蛋白和 DNA 间的相互作用。图 8 - 33 给出了一种模式,描绘了转录时核小体是如何解体的。

第六节　核基质与核体

一、核基质

在真核细胞的核内除染色质、核膜与核仁外,还有一个以蛋白质成分为主的网架结构体系,这一网架结构体系最初由 Coffey 和 Berezney 等人(1974)从大鼠肝细胞核中分离出来。他们用核酸酶(DNase 和 RNase)与高盐溶液对细胞核进行处理,将 DNA、组蛋白和 RNA 抽提后发现核内仍残留有纤维蛋白的网架结构,并将其称之为核基质(nuclear matrix)。因为它的基本形态与胞质骨架很相似,又与胞质骨架体系有一定的联系,因此有人称之为核骨架(nuclear skeleton)。近年来,核骨架的研究取得了很大进展,已成为细胞生物学研究的一个前沿领域。目前,对核骨架可以有两种理解:广义的概念,核骨架应包括核基质、核纤层(或核纤层 - 核孔复合体结构体系),以及染色体骨架(chromosome scaffold)。另一种狭义的概念仅把核骨架具体理解为核基质。我们这里明确提出的核基质就是指在细胞核内,除了核被膜、核纤层、染色质与核仁以外的网架结构体系。从这一理解出发核骨架与核基质具有等同含义。

迄今为止,对核骨架的研究认识大致可归纳为:

(1) 核骨架是存在于真核细胞核内真实的结构体系。

(2) 核骨架与核纤层、中间纤维相互连接形成的网络体系,是贯穿于核与质的一个独立结构系统。

(3) 核骨架的主要成分是由非组蛋白的纤维蛋白构成的,含有多种蛋白成分。少量 RNA 的存在可能对维持核骨架结构的完整性是必要的。

(4) 核骨架与 DNA 复制、基因表达及染色体的包装与构建有密切关系。

有关核基质的详细知识请阅读第十章细胞骨架的叙述。

二、核体

高等真核细胞的间期核内除染色质与核仁结构外,最近几年在染色质之间

的空间还发现含许多形态上不同的亚核结构域(subnuclear domain),统称为核体(nuclear bodies,NBs)。在细胞的各种事件中,核体可能代表不同核组分的储存或查封位点或称之为分子货仓(molecular warehouse)。综合近年来的研究,首先,电镜超微结构研究已区分出几种不同类型的核体,其中有两种主要亚型:螺旋体(coiled bodies,CBs)和早幼粒细胞白血病蛋白体(promyelocytic leukaemia protein bodies,PML bodies)。由于螺旋体和PML体都与遗传疾病相关,所以CBs和PML体的研究倍受关注。

螺旋体结构已在植物和动物的不同物种的间期核中被识别,其典型结构表现为直径约0.5 μm,呈螺旋状缠结的电子致密的纤丝结构。螺旋体的分子组分鉴定工作始于20世纪90年代,所报道的在螺旋体区域富集的各种组分的数目不断迅速增长,迄今已有30余种,包括各种核内小核糖核蛋白质(snRNP)、核和细胞周期控制蛋白,以及几种基本转录因子。其中p80 coilin蛋白是免疫电镜研究的标志蛋白(signature protein),含有典型的NLSs和大量丝氨酸磷酸化位点。最近证实,coilin不仅能高亲和地结合poly r(G)同聚体和单链DNA,而且也能与U7 snRNP形成复合体。应用标记的UTP为前体的脉冲标记实验证实,螺旋体的功能涉及snRNP的生物发生(biogenesis)。进一步研究发现,CBs是一种具有多功能的细胞器,在指导核内snRNA分选中起主要作用,而且可能是snRNP和小核仁核糖核蛋白(snoRNP)的生物合成途径中的义务站点。还发现CBs与snRNA和组蛋白基因结合,还能同时与多个染色体基因座相互作用,因此推测CBs在基因表达协调反馈调节中也起作用。

早幼粒细胞白血病蛋白体在形态上与CBs不同,为环形和其他简单的核体组成一类亚结构,直径约0.5 μm,围绕一个不含PML的中央核心组成一个含有PML的密结环。已发现含有20多种不同组分,其标志蛋白是早幼粒细胞白血病蛋白(PML蛋白)。PML体也是一种多功能细胞器,其功能不仅涉及转录调节的许多方面,而且是病毒感染的靶结构。此外近年来研究发现,PML体组成的改变与某些疾病表型的发生有关。在急性早幼粒细胞白血病(APL)病人中,发现PML体的破坏是APL病因学的共同特征。这种病人携带一种频发易位(t15;17:q22;q21),这种易位涉及编码早幼粒细胞白血病蛋白(PML)和视黄酸受体α(RNRα)的基因,易位基因产生一种融合蛋白,这种PML-RNRα融合蛋白不仅不能定位在源于病人细胞系的PML体内,而且对野生型PML的定位也有显著的影响,其作用是阻断野生型PML的作用,赋予APL细胞的存活优势和导致白血病。现有研究表明,PML蛋白的功能可能是作为负生长调节子(negative growth regulon)和肿瘤抑制子而发挥作用。最近,基因剔除(gene knockout)研究发现,Pml-/-小鼠可存活,但对肿瘤和病毒更为易感。进一步的研究还发现PML的一个作用可能是介导程序性细胞死亡。用许多外源性的细胞信号包括细胞因子和γ射线处理细胞和细胞系,导致PML的上升调节(upregulation),即增加PML体的大小和引起细胞凋亡,而PML-RNRα融合蛋白则抑制PML的下游作用,阻断细胞凋亡和早幼粒细胞的分化。用视黄酸或砷化合物处

理引起融合蛋白降解并缓解阻断作用。此外，还发现 PML 体在细胞周期调控中起作用。

提　要

细胞核是真核细胞内最大、最重要的细胞器，是细胞遗传与代谢的调控中心。细胞核主要由核被膜（包括核孔复合体）、染色质、核仁及核骨架组成。核被膜与核孔复合体是真核细胞所特有的结构，核被膜作为细胞核与细胞质之间的界膜，将细胞分成核与质两大结构与功能区域，从而使转录与翻译这两个基因表达的基本过程在时空上分开。在细胞周期中，核被膜经历有规律地解体与重建。与核膜相连系的核孔复合体是一种复杂的跨膜运输蛋白复合体，核孔复合体主要由胞质环、核质环、辐和栓 4 种结构亚单位组成，在核质面与胞质面呈不对称性分布，构成核质交换的双向选择性亲水通道，核质之间主要通过核孔复合体实现频繁的物质交换与信息交流。

染色质是间期细胞核内由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA 组成的线性复合结构。构成染色质的 DNA 包括 B 型、A 型和 Z 型三种构型，不同构型的 DNA 其大沟和小沟的特征在遗传信息的表达中起关键作用。真核细胞染色质 DNA 序列的组织性复杂，包括单一序列、中度重复序列和高度重复序列。构成染色质的蛋白负责 DNA 遗传信息的组织、复制和阅读。其中组蛋白是基本结构蛋白，与 DNA 非特异性结合；非组蛋白是序列特异性 DNA 结合蛋白，是重要的基因调控蛋白，它们具有不同的结构模式，形成不同的 DNA 结合蛋白家族。

20 世纪 70 年代发现，核小体是构成染色质的基本结构单位，每个核小体由组蛋白八聚体核心及 200 bp 左右的 DNA 和一分子组蛋白 H1 组成。间期染色质按其形态表现、染色和生化特点，可分为常染色质与异染色质两类，异染色质又分为结构异染色质和兼性异染色质。处于常染色质状态只是基因转录的必要条件而非充分条件，因此，按其功能状态又将染色质分为活性染色质和非活性染色质。在真核细胞，染色质的结构与基因表达有密切关系。主要问题有三个方面：一是如何形成活性染色质中的超敏感结构以便 RNA 聚合酶能起始转录；二是具有转录活性的染色质结构域如何与周围的非活性区域隔离；三是 RNA 聚合酶如何通过与组蛋白结合的 DNA 模板进行转录。

染色体是细胞有丝分裂时遗传物质存在的特殊形式，是间期染色质紧密包装的结果。中期染色体具有比较稳定的形态。在细胞世代中确保染色体的复制和稳定遗传，染色体起码具备三种功能元件：一个 DNA 复制起点，一个着丝粒和两个端粒。细胞染色体组在有丝分裂中期的表型称为核型，核型具有物种特异性。用特殊染色技术可使染色体显示特殊的带型，从而提示染色体带作为更大范围的结构域对细胞的功能可能是重要的。此外，在某些生物的细胞中，特别是在发育的某些阶段，可以观察到特殊的巨大染色体，包括多线染色体和灯刷染色体。

核仁是真核细胞间期核中最显著的结构，其形态、大小随细胞类型和细胞代谢状态不同而变化。核仁普遍存在三种基本组分：纤维中心(FC)、致密纤维组分(DFC)和颗粒组分(GC)。新近比较一致的看法认为，FCs是rRNA基因的储存位点，转录主要发生在FC与DFC的交界处，初始rRNA转录物首先出现在DFC并在那里加工；某些加工步骤也发生在颗粒组分区(GC)，并负责将rRNA与核糖体蛋白装配成核糖体亚单位，所以GC代表核糖体亚单位成熟和储存的位点。核仁的主要功能涉及核糖体的生物发生，这是一个向量过程。该过程包括rRNA的合成、加工和核糖体亚单位的装配。在细胞周期中，核仁是一种高度动态的结构，在有丝分裂过程中表现出周期性的解体与重建。间期核核仁结构整合性的维持和有丝分裂后期核仁的重建，都需要rRNA基因的活性。

在真核细胞的核内除染色质、核膜与核仁外，还有一个以蛋白质成分为主的网架结构体系，即核基质，这一结构体系与DNA复制、基因表达和染色体包装与构建有密切关系。

高等真核细胞的间期核内除染色质与核仁结构外，新近发现染色质之间的空间还含有许多形态上不同的亚核结构域，统称为核体。在细胞的各种事件中，核体可能代表不同核组分的分子货仓。

思　考　题

1. 概述细胞核的基本结构及其主要功能。
2. 试述核孔复合体的结构及其功能。
3. 概述染色质的类型及其特征。
4. 比较组蛋白与非组蛋白的特点及其作用。
5. 试述核小体的结构要点及其实验证据。
6. 试述从DNA到染色体的包装过程。
7. 分析中期染色体的三种功能元件及其作用。
8. 概述核仁的结构及其功能。
9. 概述活性染色质的主要特点。
10. 试述染色质结构与基因转录的关系。
11. 自行选择重要名词并进行解释。

参 考 文 献

1. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: concepts and experiments, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999

2. Bruce Alberts *et al*. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. New York & London: Garland Publishing Inc., 1994

3. Bruce Alberts *et al*. Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. New York & London: Garland Publishing Inc., 1998

4. Benjamin Lewin. Genes Ⅵ. New York: Oxford University Press Inc., 1997

5. Douglass J Forbes and Alexander D Johnson. Current Opinion in Cell Biology: Nucleus and gene expression. Vol 7. No3, 1995

6. Bradford Talcott and Mary Shannon Moore. Getting across the nuclear pore complex. Trends in Cell Biology Vol. 9: 312～318 August, 1999

7. Fruke Melchior and Larry Gerace. Two－way trafficking with Ran. Trends in Cell Biology., Vol 8: 175～179, May, 1998

8. Bertil Daneholt. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. Cell, Vol. 88: 585～588, March 7, 1997

9. Angus I. Lamond and William C. Earnshaw. Structure and Function in the Nucleus. Science, Vol. 280(24): 547～553, April, 1998

10. Karolin Luger *et al*. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. Nature, Vol 389(18): 251～259, Sept. 1997

11. A Gregory Matera. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. Trends in Cell Biology Vol. 9: 302～309 August, 1999

12. Erich A. Nigg. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. Nature Vol 386(24): 779～787, April, 1997

13. 翟中和主编．细胞生物学．北京:高等教育出版社,1995

14. 汪堃仁,薛绍白,柳惠图主编.细胞生物学(第二版).北京:北京师范大学出版社,1998

第九章

核　糖　体

第一节　核糖体的类型与结构

核糖体是合成蛋白质的细胞器，其唯一的功能是按照 mRNA 的指令由氨基酸高效且精确地合成多肽链。1953 年，Robinsin 和 Brown 用电镜观察植物细胞时发现了这种颗粒结构。1955 年 Palade 在动物细胞中也观察到类似的结构。1958 年 Roberts 建议把这种颗粒结构命名为核糖核蛋白体（ribosome），简称核蛋白体或核糖体。

核糖体几乎存在于一切细胞内，不论是原核细胞还是真核细胞，均含有大量的核糖体。即使最小最简单的细胞支原体，也至少含有数以百计的核糖体。线粒体和叶绿体中也含有核糖体。目前，仅发现在哺乳动物成熟的红细胞等极个别高度分化的细胞内没有核糖体。因此可以说核糖体是细胞最基本的不可缺少的结构。

核糖体是一种颗粒状的结构，没有被膜包裹，其直径为 25 nm，主要成分是蛋白质与 RNA。核糖体 RNA 称为 rRNA，蛋白质称 r 蛋白，蛋白质含量约占 40%，RNA 约占 60%。r 蛋白分子主要分布在核糖体的表面，而 rRNA 则位于内部，二者靠非共价键结合在一起。

在真核细胞中很多核糖体附着在内质网的膜表面，称为附着核糖体，它与内质网形成复合细胞器，即糙面内质网。在原核细胞的质膜内侧也常有附着核糖体。还有一些核糖体不附着在膜上，而呈游离状态，分布在细胞质基质内，称游离核糖体。附着核糖体与游离核糖体所合成的蛋白质种类不同，但核糖体的结构与化学组成是完全相同的。

核糖体常常分布在细胞内蛋白质合成旺盛的区域，其数量与蛋白质合成程度有关。处在指数生长期的细菌中，每个细胞内大约有数以万计的核糖体，其含量可达细胞干重的 40%。而在培养的饥饿状态的细胞内，仅有几百个核糖体。在体外培养的 HeLa 细胞中，核糖体的数目约为 $5\times10^6\sim1\times10^7$ 个。

从核糖体发现至今近 50 年的时间，对核糖体的结构、成分与功能的研究，积

累了丰富的材料，特别是近几年对 rRNA 的研究取得了重要的进展。精细的生物化学分析，分子生物学、免疫学及其与电子显微镜技术的配合是取得这些成果的重要实验基础。

一、核糖体的基本类型与成分

生物有机体细胞内有两种基本类型的核糖体：一种是 70*S*（*S* 为 Svedberg 沉降系数单位）的核糖体，其相对分子质量为 2 500 × 10^3，原核细胞的核糖体为 70*S*，真核细胞线粒体与叶绿体内的核糖体也近似于 70*S*；另一种是 80*S* 的核糖体，相对分子质量为 4 800 × 10^3，真核细胞的核糖体（除线粒体与叶绿体核糖体外）均为 80*S*。不论 70*S* 或 80*S* 的核糖体，均由大小不同的两个亚单位（subunit）构成（图 9－1）。体外实验表明 70*S* 的核糖体在 Mg^{2+} 浓度小于 1 mmol/L 的溶液中，易离解为 50*S* 与 30*S* 的大小亚单位，当溶液中 Mg^{2+} 浓度大于 10 mmol/L时，两个核糖体常常形成 100*S* 的二聚体。

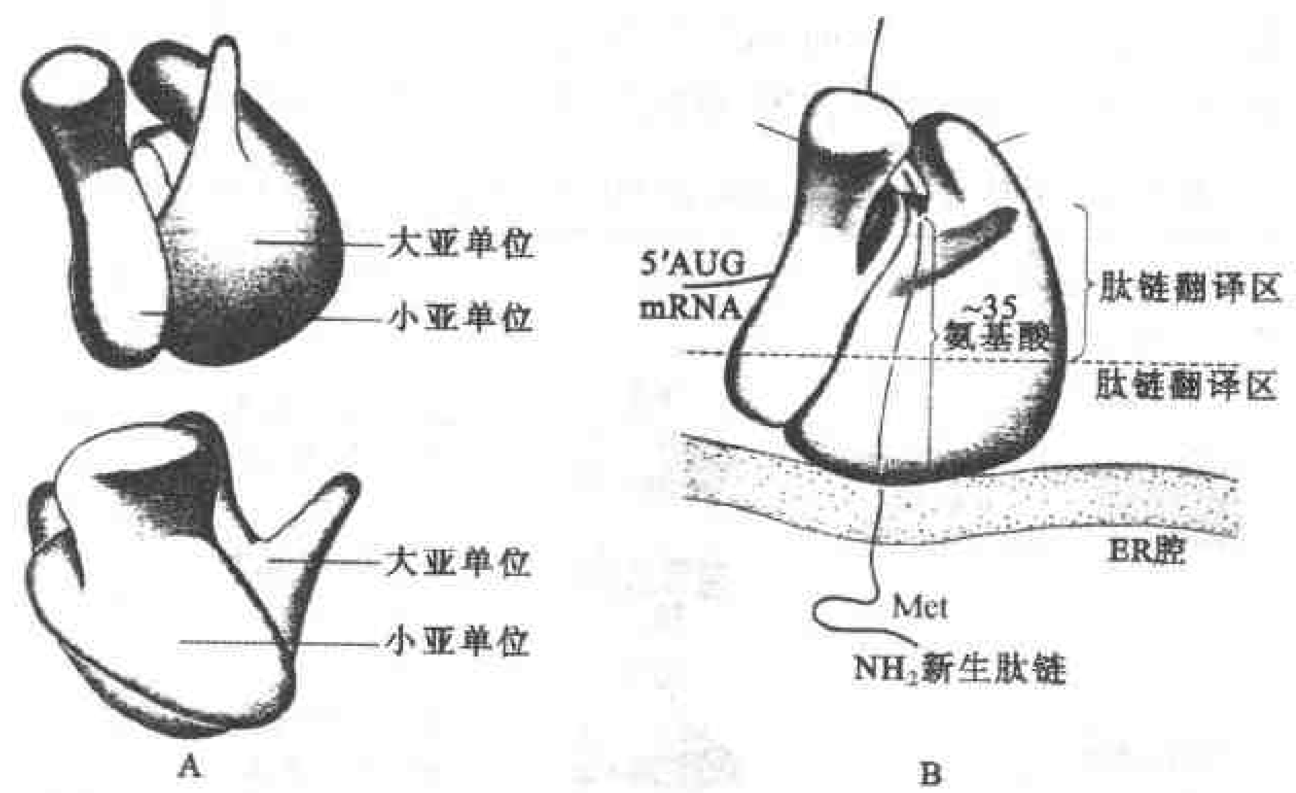


图 9－1 根据负染色图像绘制的核糖体立体结构模式图
A：不同侧面观的核糖体；B：核糖体与蛋白质合成示意图

核糖体大小亚单位在细胞内常常游离于细胞质基质中，只有当小亚单位与 mRNA 结合后大亚单位才与小亚单位结合形成完整的核糖体。肽链合成终止后，大小亚单位解离，又游离存在于细胞质基质中。

用 EDTA、尿素和一价盐可逐级去掉核糖体上的 r 蛋白，最后得到纯化的 rRNA。对核糖体的成分分析结果如表 9－1 所示，在原核细胞中 50*S* 与 30*S* 的大小亚单位的相对分子质量分别为 1 600 × 10^3 和 900 × 10^3。小亚单位中含有一个 16*S* 的 rRNA 分子，相对分子质量为 600 × 10^3，由 1 542 个核苷酸组成（*E. coli*）。大亚单位中含有一个 23*S* 的 rRNA 分子，其相对分子质量为1 200 ×

10^3,由2 904个核苷酸组成(*E.coli*)。大亚单位还含有一个5*S*的rRNA,相对分子质量为30×10^3,仅由120个核苷酸组成(*E.coli*)。从30*S*小亚单位中已发现有21种不同的蛋白质分子(称S蛋白),50*S*大亚单位约含31种蛋白质(称L蛋白)。在*E.coli*核糖体中除了L7/L12有4个拷贝,S6有2个拷贝外,其余的r蛋白仅有一个拷贝。

80*S*的核糖体普遍存在于真核细胞内,对分离的核糖体进行理化性质测定,发现与原核细胞核糖体具有类似的特征。随着溶液中Mg^{2+}浓度的降低,80*S*的核糖体可离解为60*S*与40*S*的大小亚单位,当Mg^{2+}浓度增高时,80*S*的核糖体又可形成120*S*的二聚体。对80*S*核糖体的成分分析结果如表9-1所示,60*S*与40*S*亚单位的相对分子质量分别为$3\ 200\times10^3$与$1\ 600\times10^3$。小亚单位中含有一个18*S*的rRNA分子,相对分子质量为900×10^3。大亚单位中含有一个28*S*的rRNA分子,相对分子质量为$1\ 600\times10^3$,还含有一个5*S*的rRNA分子和一个5.8*S*的rRNA分子。在不同的真核细胞中,核糖体也存在着差异,如动物细胞核糖体的大亚单位内有28*S* rRNA,而植物细胞、真菌细胞与原生动物细胞内,核糖体的大亚单位中却不是28*S* rRNA,而是25~26*S* rRNA;在低等真核生物细胞中,构成核糖体的rRNA类型比较复杂,可能不仅限于以上几种。真核生物核糖体的小亚单位约含33种蛋白,大亚单位约含49种蛋白(表9-1)。

表9-1　原核生物与真核生物核糖体成分的比较(引自Lewin,1997)

核糖体		亚基	rRNA	r蛋白
细菌 	70*S* *Mr* $2\ 500\times10^3$ 66% RNA	50*S* 	23*S*=2 904碱基 5*S*=120碱基	31
		 30*S*	16*S*=1 542碱基	21
哺乳动物 	80*S* *Mr* $4\ 200\times10^3$ 60% RNA	60*S* 	28*S*=4 718碱基 5.8*S*=160碱基 5*S*=120碱基	49
		 40*S*	18*S*=1 874碱基	33

rRNA中的某些核苷酸残基被甲基化修饰,甲基化常发生在rRNA序列较为保守的区域。如16*S* rRNA 3′端高度保守序列中二个相邻的腺嘌呤核苷酸中的4个甲基化位点G-m6A-m6A,它可能参与30*S*和50*S*的亚单位的结合过程。16*S*rRNA一般有10个甲基化位点,23*S*rRNA约有20个甲基化位点。在哺乳动物核糖体的18*S*rRNA和28*S*rRNA中,其甲基化位点分别为43个和74个,约占全部核苷酸总数的2%,远高于原核细胞的rRNA。

二、核糖体的结构

用离子交换树脂可分离纯化各种 r 蛋白。将纯化的 r 蛋白与纯化的 rRNA 进行核糖体的重装配，可进一步显示核糖体中 r 蛋白与 rRNA 的结构关系(图 9－2)。在重装配过程中，某些蛋白质必须首先结合到 rRNA 上，其他蛋白才能装配上去，即表现出先后层次。这种关系，在很大程度上可能也反映核糖体在体内装配的情况。核糖体的重装配不需要其他大分子的参与，是一个自我装配的过程。用双向电泳技术可显示出 *E.coli* 核糖体在装配各阶段中，与 rRNA 结合的蛋白质的类型。这一技术广泛地用于分析各种核糖体的亚单位及其装配中的亚单位的蛋白质成分。

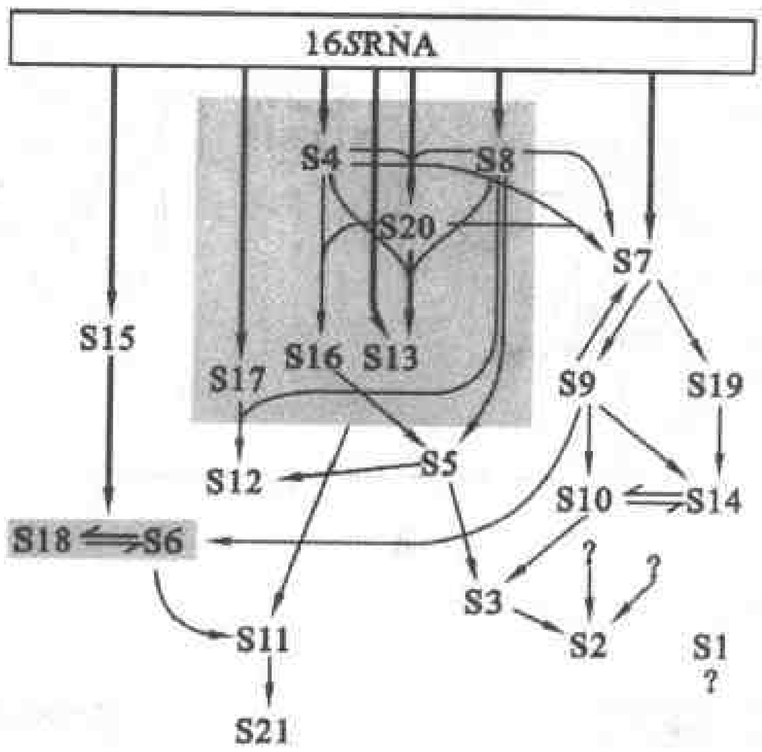
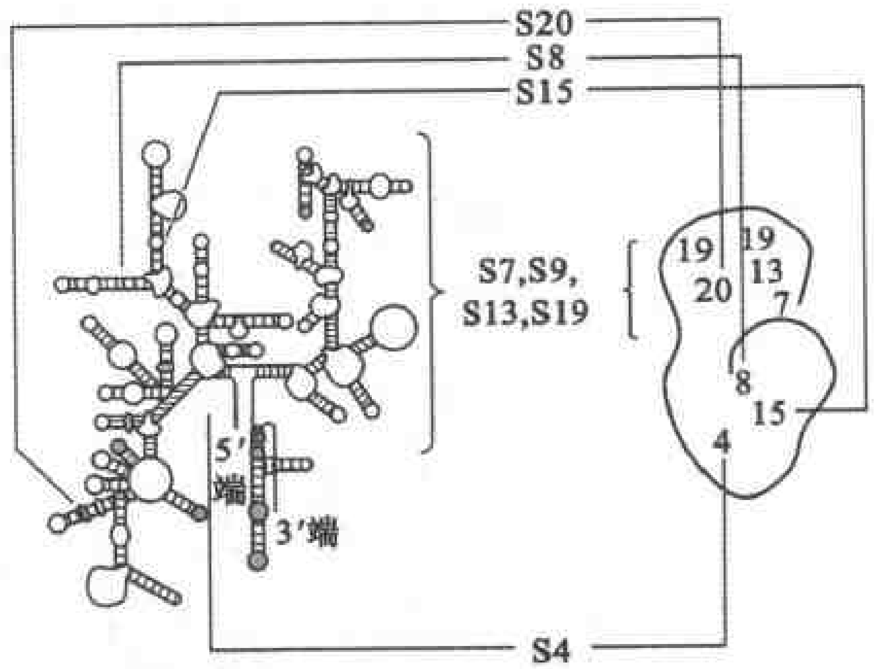


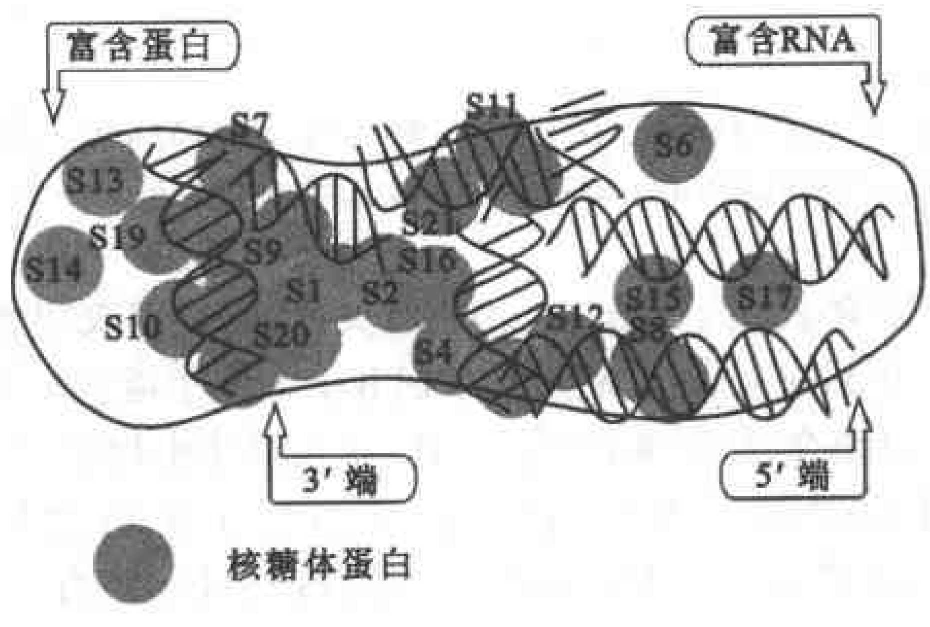
图 9－2　*E.coli* 核糖体小亚单位中 rRNA 与 r 蛋白的相互关系示意图
线条表示相互作用及作用力的强(粗线)与弱(细线)(引自 Alberts *et al*.,1989)

为了进一步研究 r 蛋白在结构上的相互关系，常使用双功能的交联剂（difunctional cross－linking agent)，利用交联剂分子中两个活泼的基团分别与蛋白质中某些基团共价结合，结果像订书钉一样，把核糖体中相邻的蛋白质分子共价结合在一起，再经双向电泳分离后，便可测出 r 蛋白之间的空间关系。H.G.Wittman 纯化了 *E.coli* 核糖体中的 52 种蛋白质，并测出其一级结构，发现除 L7 和 L12 两种蛋白具有相同的氨基酸序列(所不同的是 L7 在 N 端有一个酰基)外，几乎所有蛋白的一级结构都有很大不同，因而在免疫学上也几乎没有同源性。进而将纯化的 *E.coli* 的各种 r 蛋白制成抗体，发现从不同原核生物中分离的 r 蛋白之间有很高的同源性，序列分析也证实了这一点，说明在不同物种的细胞中，核糖体可能来源于一个共同的祖先，并在进化上是非常保守的，甚至在 *E.coli* 与植物叶绿体中的 r 蛋白也有很高的同源性。同样，在不同的真核生

物中，r 蛋白之间也普遍存在很高的同源性，甚至在 *E.coli* 与大鼠的某些 r 蛋白之间也显示出很强的免疫交叉反应。上述工作为进一步分析某一种 r 蛋白的哪一结构域与另一种 r 蛋白或与 rRNA 的结合打下了基础。最直观的方法是，电镜负染色与免疫标记技术结合起来，研究 r 蛋白在核糖体的亚单位上的定位。抗体分子具有两个抗原的结合位点，将抗某一种 r 蛋白的抗体加入纯化的核糖体亚单位中后，两个亚单位就会被同一个抗体分子在相同的部位上交联在一起，与未加抗体的核糖体亚单位的电镜图片进行比较，便可知道抗原决定簇，即该种 r 蛋白在亚单位上的位置。目前已了解 *E.coli* 核糖体的几乎全部 r 蛋白的分布及其相互关系(图 9－3)。



A



B

图 9－3　*E.coli* 核糖体小亚单位中的部分 r 蛋白与 rRNA 的结合位点(A)及其在小亚单位上的部位(B)

(引自 Albert *et al*.，1989，图 A；Lewin，1997，图 B)

对 rRNA，特别是对 16*S* rRNA 结构的研究已积累了丰富的资料。通过对 500 多种不同生物的 rRNA 序列的分析，发现其一级结构是非常保守的，某些序

列是完全一致的。16SrRNA 的二级结构具有更高的保守性,尽管不同种的 rRNA 的一级结构可能有所不同,但它们都折叠成相似的二级结构——即由多个臂环(stem－loop structure)所组成的结构(图 9－4)。其中不到半数的碱基配对,且双螺旋区(臂)一般小于 8 bp,而未配对的碱基形成环。整个 16SrRNA 可分成 4 个结构域即中心结构域(central domain)、5′端结构域(5′domain)、3′主结构域(3′major domain)及其与中心结构域之间的主结构域(major domain)(图 9－3)。rRNA 与 r 蛋白之间的结构关系,可用多种技术来研究。如根据与蛋白结合的 rRNA 的某一区域往往更能耐受核酸酶的水解,可用 RNA 酶温和地水解核糖体,经分离后,分析被保护的核苷酸序列及与之相结合的蛋白质成分。此外还可用交联剂将结合在 rRNA 上的蛋白与结合位点处的 rRNA 碱基共价交联后,进一步做序列分析,用这些方法发现位于核糖体 A 位点的 tRNA 和位于 P 位点的 tRNA 与 16*S* rRNA 的结合部位,这些部位都处在 16SrRNA 的高度保守序列上。通过中子衍射技术(neutron diffraction)分析可获得 rRNA 臂环结构的三级结构模型,再根据与蛋白质结合的 rRNA 序列以及蛋白质与蛋白质之间的关系,提出 70S 核糖体的小亚单位中 rRNA 与全部 r 蛋白关系的空间模型。

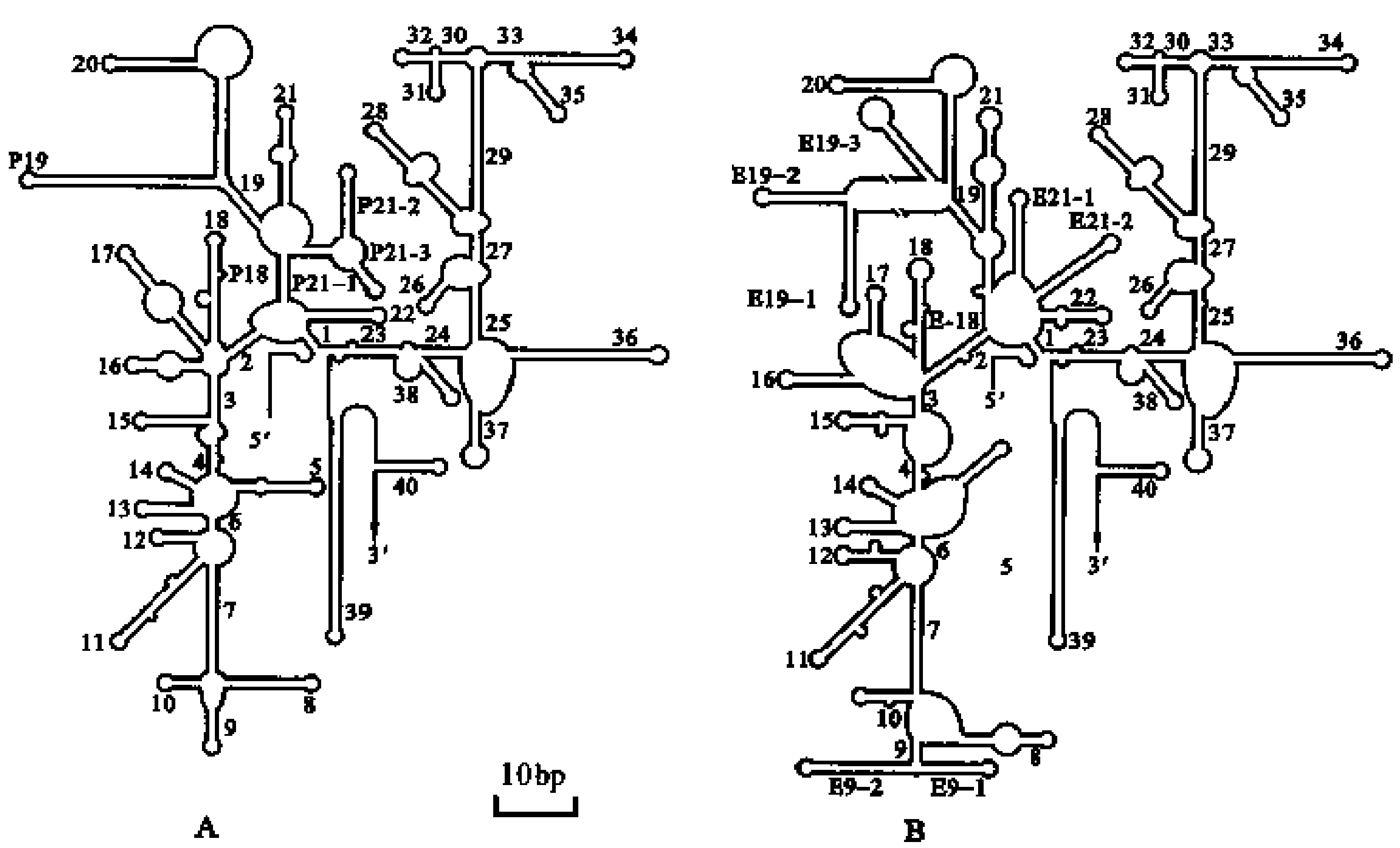


图 9－4 核糖体小亚单位 rRNA 的二级结构

A: *E.coli* 16*S* rRNA;B: 酵母菌 18*S* rRNA,它们都具有类似的 40 个臂环结构(图中 1～40),其长度和位置往往非常保守;P、E 分别代表仅在原核或真核细胞中存在的 rRNA 的二级结构(引自 Lodish *et al.*,1995)

以上技术已用于对 50*S* 亚单位的分析,并已取得了一些重要的进展。近年发现,蛋白质合成进程中很多重要步骤与核糖体 50*S* 大亚单位相关,如:

(1) 依赖延伸因子 Tu(EF－Tu)的氨酰 tRNA 的结合;

(2) 延伸因子 G(EF－G)介导的转位作用;

(3) 依赖于起始因子 2 的 fMet－tRNA 的结合;

(4) 依赖于释放因子的蛋白合成终止作用;

(5) 应急因子(stringent factor ,在营养缺乏条件下,促代谢水平迅速下降的因子)与核糖体结合产生 ppGpp(p)阻断蛋白合成等。

上述过程中的多数因子为 G 蛋白,具有 GTPase 活性,故将核糖体上与之相关位点称为 GTPase 相关位点。

应用遗传突变株、化学交联和 RNA 与蛋白结合的足迹法等技术证明,在核糖体 50*S* 大亚单位上 GTPase 相关位点主要涉及二部分:

(1) 核糖体蛋白 L11 和 rRNA 复合物(*E.coli* 中为 23*S* rRNA 的 1 030～1 125核苷酸片段)和 L10(L12)$_4$ 形成的五聚体,其中两个 L12 二聚体(N 端结构域相结合)通过 L10 结合在 rRNA 片段上且与 L11 毗邻,L12 二聚体形成 50*S* 大亚单位的突起部分,其 C 端可相对运动。L11－rRNA 片段也位于这一区域,它也是阻碍 GTPase 相关位点的各种因子作用的抗生素如硫肽抗生素、硫链丝菌肽(thiostrepton)和小球菌素(micrococcin)的结合区域。

(2) 核糖体毒作用的颈－环(ribotoxin stem－loop)区(*E.coli* 23*S* rRNA 中 2 645～2 675 核苷酸片段和相关 r 蛋白形成)。细胞毒作用蛋白,如 α－sarcin 和蓖麻蛋白(ricin)可与之作用,同样可阻断核糖体因子的结合与作用。

二级结构分析发现,L11－rRNA 复合物中的 rRNA 片段形成 4 个双螺旋区均结合在端部颈上,其中包括 A1 095 颈环和附有 A1 067 的 U1 082 发夹结构,共同形成一个包装紧密的结构域。其中还含有 Ca^{2+}。

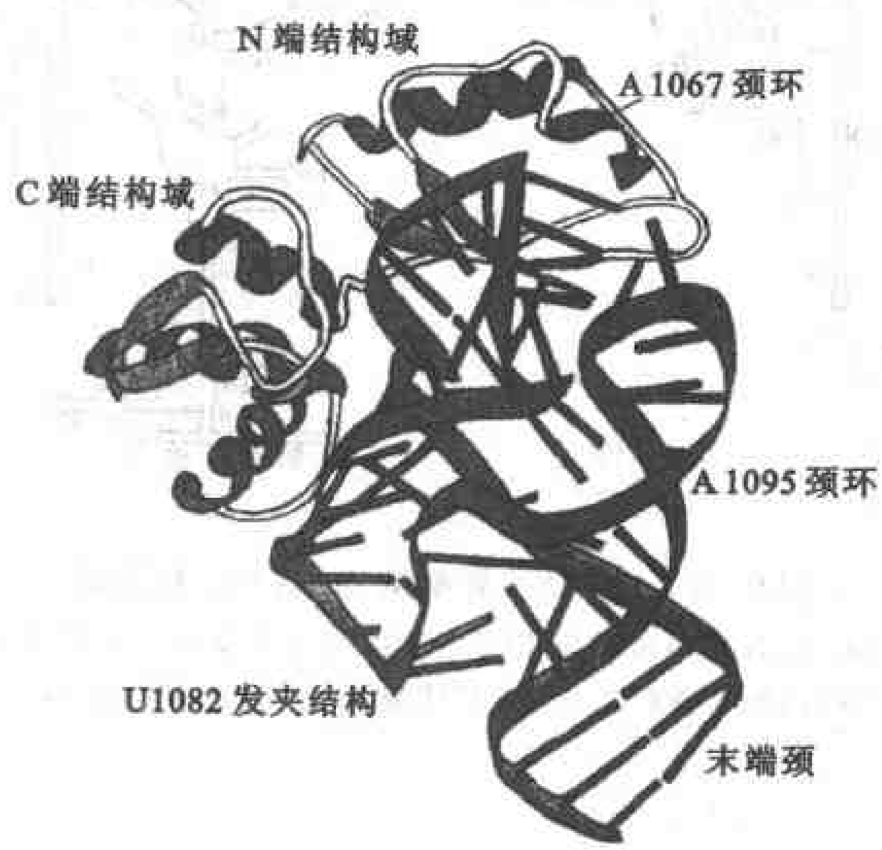


图 9－5　L11－rRNA 复合物的三维结构
(引自 Porse *et al*.,1999)

L11 蛋白有两个球形结构域，C 端结构域形成的伸展多肽链与 rRNA 骨架相结合。

最近人们成功地制备了 L11 – rRNA 复合物的晶体，获得了其空间结构高分辨率的三维图像(图 9 – 5)。这一结果不仅证实了前人用各种实验技术所获得的种种推论，而且提出直观、可靠且比人们的预料更为精巧复杂和可行的作用机制，从而为揭开核糖体这一具有 30 多亿年历史的古老的高度复杂的分子机器的运转奥秘迈出了极重要的一步。

三、核糖体蛋白质与 rRNA 的功能

核糖体上具有一系列与蛋白质合成有关的结合位点与催化位点(图 9 – 6)：

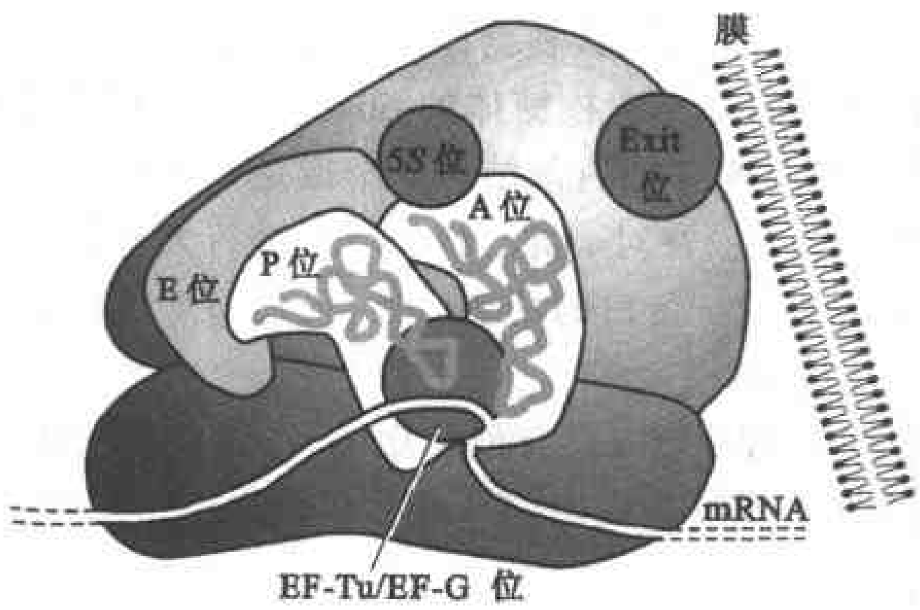


图 9 – 6　核糖体中主要活性部位示意图(引自 Lewin，1997)

(1) 与 mRNA 的结合位点；

(2) 与新掺入的氨酰 tRNA 的结合位点——氨酰基位点，又称 A 位点；

(3) 与延伸中的肽酰 tRNA 的结合位点——肽酰基位点，又称 P 位点；

(4) 肽酰转移后与即将释放的 tRNA 的结合位点——E 位点；

(5) 与肽酰 tRNA 从 A 位点转移到 P 位点有关的转移酶(即延伸因子 EF – G)的结合位点；

(6) 肽酰转移酶的催化位点。

此外还有与蛋白质合成有关的其他起始因子、延伸因子和终止因子的结合位点。对这些结合位点位于核糖体的哪个亚单位上及其确切位点，近年来已有比较多的了解。

已知与 tRNA 结合的 P 位点、A 位点或 E 位点各自都涉及一套 rRNA 上不同的区域。16SrRNA 与 tRNA 同 P 位点和 A 位点的结合有关；23SrRNA 与 tRNA 同 P 位点、A 位点和 E 位点的结合有关。例如与 tRNA 结合的 A 位点，在 16SrRNA 中主要位于 530 和 1 400/1 500 区域两部分(数码指 rRNA 核苷酸序

号),这也是 16*S* rRNA 两个最保守的区域,与 tRNA 结合最强的区域是 G530,A1 492 和 A1 493(英文字母代表碱基种类),其次是 A1 408 和 G1 494。在 16*S* rRNA 和 23*S* rRNA 中与 A 位点、P 位点或 E 位点有关的碱基序列几乎都是共同的保守序列。而且与各结合位点有关的一套碱基又各自不同。某些 r 蛋白,如小亚单位上的 S2、S3 和 S14 参与氨酰 tRNA 与 A 位点的结合;L13 和 L27 则是大亚单位上 P 位点的组成成分。延伸因子 EF-G 和 EF-Tu 结合到大亚单位的一套相同位点上,位于 23*S*rRNA2 660 区域的共同保守序列,特别是与 G2 655、A2 660 和 G2 661 结合更为紧密,这些区域也涉及到 r 蛋白 L11 和 L7/L12,它们位于大亚单位突起的底部,均与 EF-G 的功能有关。在研究这些结合位点时,人们也注意到处于不同的结合条件下,核糖体的构象发生了相应的变化,而这些变化对核糖体行使其功能可能是十分必要的。

核糖体中最主要的活性部位是肽酰转移酶的催化位点。早些时候人们普遍认为既然酶的本质是蛋白质,那么核糖体中一定有某种 r 蛋白与蛋白质合成中的催化作用有关。虽然 RNA 占核糖体的 60%,但长期以来它仅仅被看做是 r 蛋白的组织者,即形成核糖体的内部结构框架或是与蛋白质合成过程中所涉及到的 RNA 碱基配对有关。在对 r 蛋白和 rRNA 进行大量研究特别是利用化学方法和遗传突变株来研究 r 蛋白的功能以后,人们对 r 蛋白是否具有催化蛋白质合成的活性提出了疑问:

(1) 很难确定哪一种 r 蛋白具有催化功能,在 *E.coli* 中很多 r 蛋白突变甚至缺失对蛋白质合成并没有表现出“全”或“无”的影响,即并不引起蛋白质合成的完全抑制。

(2) 多数抗蛋白质合成抑制剂的突变株,并非由于 r 蛋白的基因突变而往往是 rRNA 基因发生了突变。

(3) 在整个进化过程中,rRNA 的结构比 r 蛋白的结构具有更高的保守性。越来越多的事实使人们推测,rRNA 在蛋白质合成过程中可能具有重要作用。

Noller 用高浓度的蛋白酶 K、强离子型去污剂 SDS 以及苯酚等试剂处理大肠杆菌 50*S* 的大亚单位,去掉与 23*S* rRNA 结合的各种 r 蛋白,结果发现,得到的 23*S* rRNA 仍具有肽酰转移酶的活性。用对肽酰转移酶敏感的抗生素处理或用核酸酶处理均可抑制其合成多肽的活性,但用阻断蛋白质合成其他步骤的抗生素处理,则肽酰转移酶活性不受影响。这些结果初步揭示了在核糖体 50*S* 大亚单位中,23*S*rRNA 参与催化肽酰转移酶的功能。当然抽提后的 23*S* rRNA 中,还残存不到 5% 的 r 蛋白,这些 r 蛋白很可能是维持 rRNA 构象所必需的。1985 年,Cech 发现 RNA 具有催化 RNA 拼接过程的活性。1992 年又证明,RNA 具有催化蛋白质合成的活性,这一重要发现不仅有力推动了对核糖体结构与功能的研究,而且对生命的起源与进化过程的探索也提供了重要的依据。

目前认为,在核糖体中 rRNA 是起主要作用的结构成分,其主要功能是:

(1) 具有肽酰转移酶的活性;

(2) 为 tRNA 提供结合位点(A 位点、P 位点和 E 位点);

(3) 为多种蛋白质合成因子提供结合位点;

(4) 在蛋白质合成起始时参与同 mRNA 选择性地结合以及在肽链的延伸中与 mRNA 结合。此外核糖体大小亚单位的结合、校正阅读(proofreading)、无意义链或框架漂移的校正、以及抗生素的作用等都与 rRNA 有关。

r 蛋白在翻译过程中也起着重要的作用,如果缺失某一种 r 蛋白或对它进行化学修饰,或 r 蛋白的基因发生突变,都将会影响核糖体的功能,降低多肽合成的活性。目前关于 r 蛋白的功能有多种推测,主要有:① 对 rRNA 折叠成有功能的三维结构是十分重要的;② 在蛋白质合成中,核糖体的空间构象发生一系列的变化,某些 r 蛋白可能对核糖体的构象起"微调"作用;③ 在核糖体的结合位点上甚至可能在催化作用中,r 蛋白与 rRNA 共同行使功能。

第二节 多聚核糖体与蛋白质的合成

一、多聚核糖体

核糖体是蛋白质合成的机器(图 9-7)。但核糖体在细胞内并不是单个独立地执行功能,而是由多个甚至几十个核糖体串连在一条 mRNA 分子上高效地进行肽链的合成。这种具有特殊功能与形态结构的核糖体与 mRNA 的聚合体称为多聚核糖体(polyribosome 或 polysome)。在细胞的超薄切片中,不论是附着核糖体还是游离核糖体,经常可以看到它们串联排列成簇状、环状、串珠状,甚至雪花状等等。每种多聚核糖体所包含的核糖体数量是由mRNA的长度来决定的,也就是说,mRNA 越长,合成的多肽分子量越大,核糖体的数目也越多。Waner 和 Rich 等发现网织红细胞内合成血红蛋白分子的多聚核糖体常常含有 5 个核糖体。根据血红蛋白的一条多肽链的大小(约 150 个氨基酸)可推算出其 mRNA 分子的长度约为 150 nm。他们用密度梯度离心技术与电镜负染色技术相结合,观察到网织红细胞内,多聚核

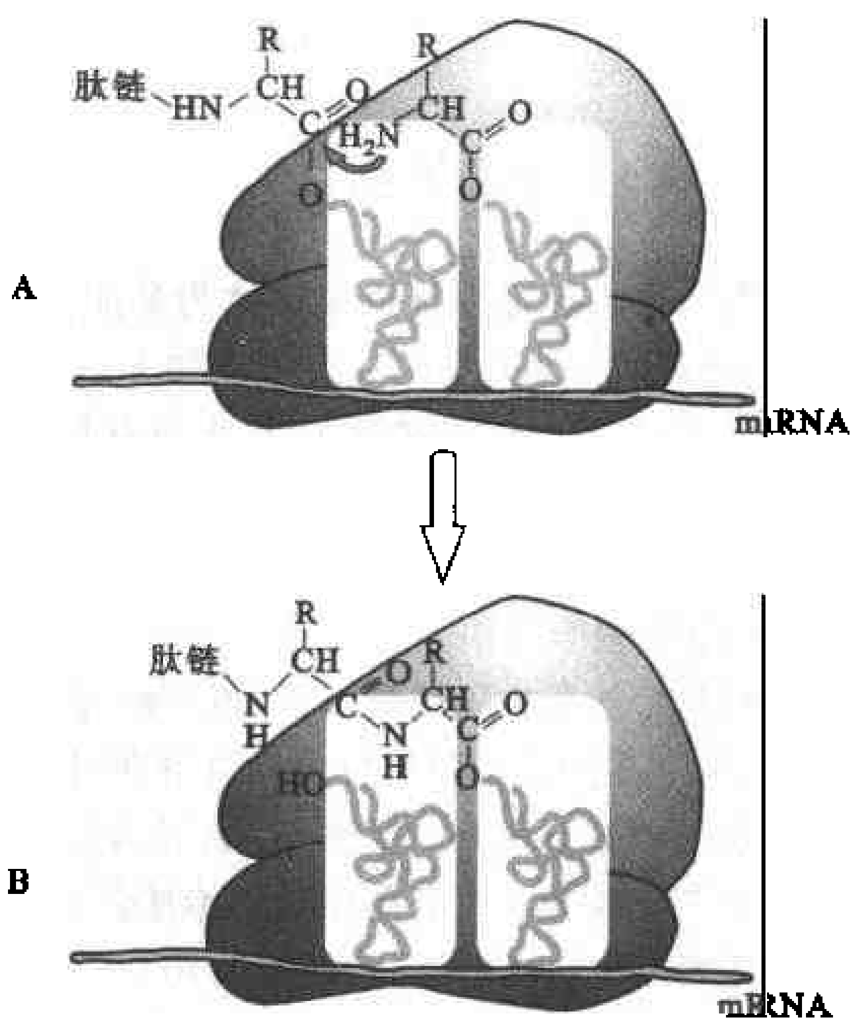


图 9-7 肽链合成反应的示意图(引自 Lewin,1997)

糖体是由一条直径约 1～1.5 nm 的 mRNA 串连 5 个(有时 6 个或 4 个)核糖体，相邻核糖体的中心间距为 30～35 nm，多聚核糖体的总长约 150 nm，这与前面的推论相符。细菌的 β 半乳糖苷酶由 1 100 个氨基酸残基组成，它的多聚核糖体中含有约 50 个核糖体，如将 β 半乳糖苷酶的基因截短，mRNA 的长度随之缩短，多聚核糖体的大小及核糖体的数目也成比例地减少。

在真核细胞中每个核糖体每秒能将两个氨基酸残基加到多肽链上，而在细菌细胞中可将 20 个氨基酸加到多肽链上，因此合成一条完整的多肽链平均需要 20 s～几分钟，即使在这样短的时间里，当第一个核糖体结合到 mRNA 上起始蛋白质合成后，不久第二个核糖体便结合到 mRNA 上，相邻的核糖体间距约 80 个核苷酸的距离。由于蛋白质的合成是以多聚核糖体的形式进行，这样细胞内各种多肽的合成，不论其相对分子质量的大小或是 mRNA 的长短如何，单位时间内所合成的多肽分子数目都大体相等，即在相同数量的 mRNA 的情况下，可大大提高多肽合成速度，特别是对于相对分子质量较大的多肽。多肽合成速度提高的倍数与结合在 mRNA 上的核糖体数目成正比。在细胞周期的不同阶段，细胞中数以万种的 mRNA 有些在合成，有些在降解，其种类与浓度不断发生变化，以多聚核糖体的形式进行多肽合成，对 mRNA 的利用及对其数量的调控更为经济和有效。

原核细胞中，在 mRNA 合成的同时，核糖体就结合到 mRNA 上，即由 DNA 转录 mRNA 和由 mRNA 翻译成蛋白质是同时并几乎在同一部位进行，所分离的多聚核糖体常常与 DNA 结合在一起。真核细胞中，多聚核糖体或附着在内质网上，或游离在细胞质基质中。一些证据表明游离的多聚核糖体结合在细胞骨架上。

二、蛋白质的合成

蛋白质合成的过程是以核糖体为基地并被其催化完成的。以原核细胞为例，肽链合成的基本环节与主要步骤如下：

(1) 在 mRNA 起始密码 AUG 上游有长达 6 个碱基的核糖体结合序列可与核糖体小亚单位中的 16S rRNA 的 3′端碱基配对，使 mRNA 与 30S 的核糖体小亚单位结合，接着甲酰甲硫氨酸 tRNA 的反密码子识别并与 mRNA 的 AUG 配对形成起始复合物。

形成起始复合物还需要 GTP 和 3 种蛋白起始因子即 IF1、IF2 和 IF3。IF3 参与 mRNA 同 30S 小亚单位的结合并阻止 50S 大亚单位与 30S 小亚单位结合。起始因子 IF1 和 IF2 促使 tRNA 结合到 mRNA 与 30S 小亚单位复合物上。

(2) 核糖体 50S 大亚单位与起始复合物中的 30S 亚单位结合，形成 70S 的完整的核糖体与 mRNA 的起始复合物。GTP 水解，IF1、IF2 和 IF3 释放，甲酰甲硫氨酸分子占据核糖体的 P 位点(肽酰位)并通过其反密码子和 mRNA 上的起始密码配对，确定读码框架。

(3) 肽链延伸主要包括3个步骤(图9-8)：

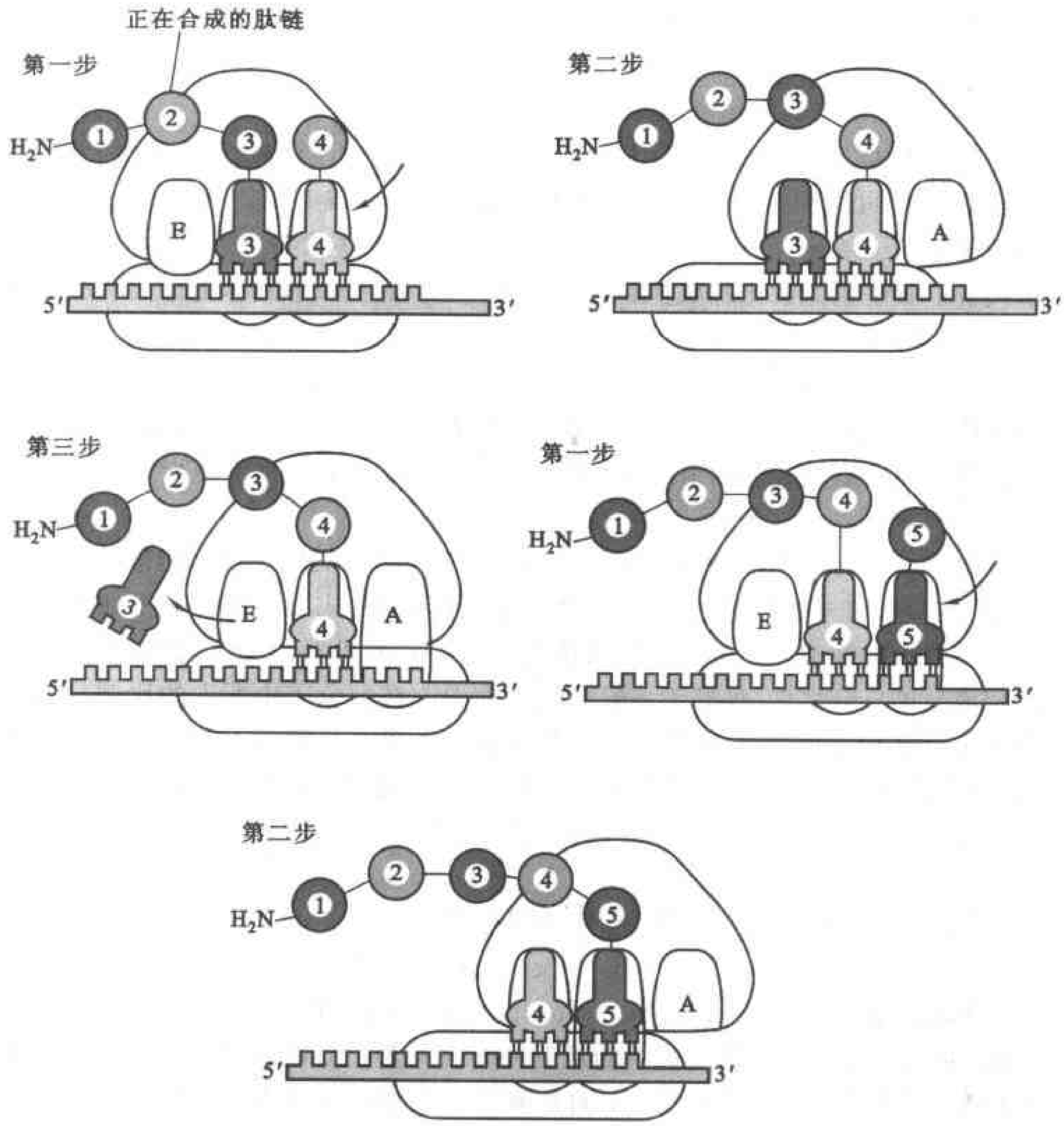


图9-8　核糖体与多肽链延伸过程示意图

主要通过三个步骤完成：1. 氨酰tRNA分子结合到核糖体A位点；2. 肽酰转移酶催化形成新的肽键；3. 核糖体小亚单位沿mRNA由5′→3′准确移动三个核苷酸的距离，E位点tRNA从核糖体释放，另一氨酰tRNA可以结合到A位点。如此循环完成整个多肽链的延伸(引自Alberts *et al.*, 1998)

① 氨酰tRNA与延伸因子EF-Tu和GTP形成的复合物相结合；

② 延伸因子EF-Tu将氨酰tRNA安置到A位点，由mRNA上的密码子决定氨酰tRNA的种类，到位后，结合在EF-Tu上的GTP水解，EF-Tu连同结合在一起的GDP离开核糖体。EF-Tu不与甲酰甲硫氨酰tRNA反应，因此起始的tRNA不能送到A位，而甲硫氨酸tRNA和其他的氨酰tRNA都可与EF-Tu结合，这就解释了为什么中间的AUG不能被起始的tRNA识读。

③ 肽链生成与移位，由肽酰转移酶催化形成二肽酰 RNA，移位需要第 3 种延伸因子 EF－G（移位酶）及结合在 EF－G 上的 GTP 水解。肽酰 tRNA 从 A 位转移到 P 位，mRNA 移动 3 个核苷酸的距离。原 P 位点无负载的 tRNA 移到 E 位点后脱落，A 位点空出。肽链以同样的方式不断延伸。

（4）蛋白质合成的终止

如 A 位是 UAA、UGA、UAG，氨基酰 tRNA 通常不能结合到核糖体上，释放因子 RF－1 可识别 UAA 或 UAG，RF－2 识别 UAA 或 UGA。A 位点的终止密码与释放因子结合，活化肽链转移酶，水解 P 位点的多肽与 tRNA 之间的连键，水代替了氨基成为活化肽酰基的受体，多肽脱离核糖体，核糖体随即离解成 30*S* 和 50*S* 亚单位。

真核细胞中核糖体小亚单位与 mRNA 5′端的 cap 识别并结合在一起，然后沿 mRNA 移动直至遇到起始密码 AUG，其蛋白质合成与原核细胞的基本相同。关于蛋白质合成过程的细节及其与核糖体的关系，在生物化学课程中有专题阐述。

尽管人们对蛋白质合成的过程及参与蛋白质合成的因子已有越来越深入的了解，然而在这一过程中，核糖体各个部件如何运转，从而快速有条不紊地完成蛋白质合成的细节尚不清楚。核糖体是一部高效的机器，它的活性部位约占其结构成分的三分之二，远高于一般酶的活性中心在酶分子中所占的比例。核糖体又是一部构象多变的机器，当核糖体的大小亚单位相结合时，核糖体中的 rRNA 构象也有所不同，推测在蛋白质合成中，正是凭借其各组分构象的不断变化与相互作用而完成这一复杂过程的各精细环节。

三、RNA 在生命起源中的地位

细胞中最主要的三种 RNA——mRNA、rRNA 和 tRNA 通过核糖体结合在一起，共同完成遗传信息表达中的最后一步——蛋白质的翻译。证明 rRNA 具有肽酰转移酶的活性，大大提高了对探索生命起源中最基本也是最富有挑战性的问题——细胞遗传信息装置起源的兴趣。

生命是自我复制的体系。推测最早出现的简单生命体中的生物大分子，应是既具有遗传信息载体功能又具有酶的催化功能。

当今细胞遗传信息传递装置中的 DNA、RNA 和蛋白质三种生物大分子，DNA 仅具有信息载体功能，而无酶活性；蛋白质具有多种酶活性而尚未发现有遗传信息载体功能；只有 RNA 既具有信息载体功能又具有酶的催化功能。因此，推测 RNA 可能是生命起源中最早的生物大分子。

RNA 的信息功能人们早已明了，mRNA 即为信使 RNA。许多病毒如艾滋病病毒和流感病毒等基因载体就是 RNA，故称 RNA 病毒。但 RNA 催化功能是近二十年才被发现。随后人们发现一系列具有催化作用的 RNA 统称核酶（ribozyme）。核酶不仅可催化 RNA 和 DNA 水解、连接、mRNA 的剪接（splicing），

在体外已证明某些 RNA 还可催化 RNA 聚合反应以及 RNA 的磷酸化、氨酰基化和烷基化等多种反应。核糖体 rRNA 中可能具有肽酰转移酶的活性，在蛋白质合成中起着关键作用。

从化学性质上推测，核糖核酸的基本成分——核糖，很容易由当时地球表面含量丰富的甲烷来合成。而脱氧核糖则需要经核糖还原而成，这一反应在细胞中是由专一的酶完成的。因此，生命的最早形式可能是由膜围绕的一套具有自我复制能力的分子体系和简单的物质与能量供应体系，其遗传物质的载体是 RNA 而不是 DNA。RNA 的催化效率远远低于蛋白质，因此整个体系复制效率很低。

在漫长的进化过程中，由 RNA 催化产生了蛋白质，进而 DNA 代替了 RNA 的遗传信息功能，蛋白质则取代了绝大部分 RNA 酶的功能，逐渐演化成今天的细胞（图 9－9）。

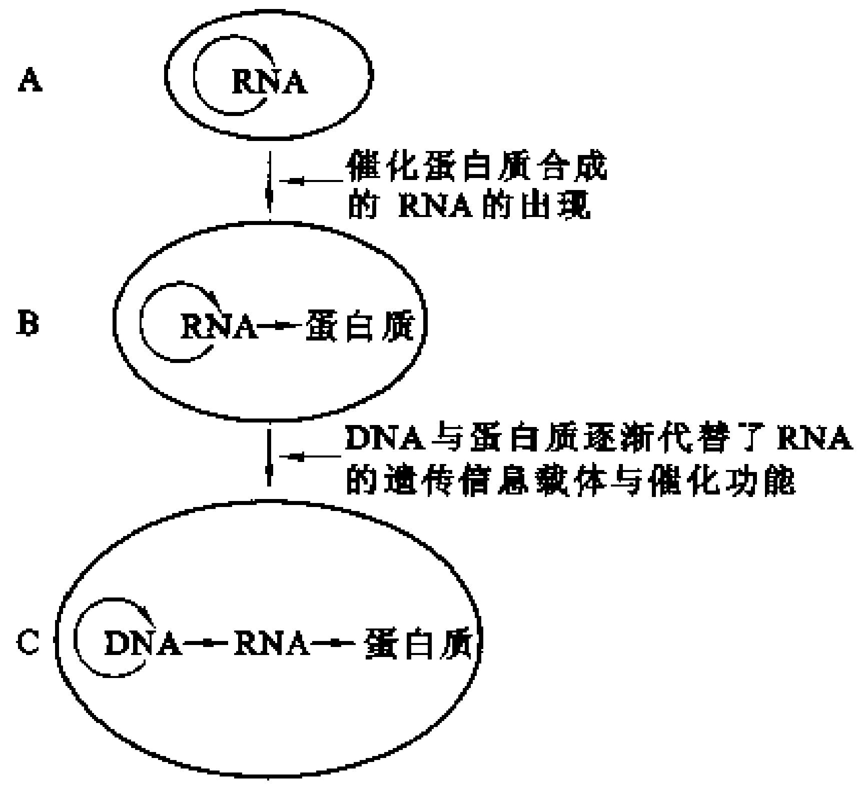


图 9－9　RNA 在生命起源中的地位及演化过程示意图

由于 DNA 链比 RNA 链稳定，双链比单链稳定且 DNA 链中胸腺嘧啶代替了 RNA 链中的尿嘧啶，使之易于修复，作为遗传物质载体则有可能贮存大量的信息并能更稳定地遗传。由于蛋白质结构的多样性与构象的多变性，不仅比 RNA 更为有效地催化多种反应，而且也提供更为复杂的细胞结构成分。这也是当今结构和功能复杂的细胞进化的基础。很有趣的是至今在遗传信息表达体系中，不仅还要通过 RNA 完成遗传信息传递和密码的翻译，而且一些重要的反应过程如 mRNA 的拼接和蛋白质的合成仍需 RNA 的催化作用。

提　要

核糖体是细胞合成蛋白质的细胞器，广泛存在于一切细胞内（除哺乳动物成

熟的红细胞等极个别高度分化的细胞)。因此,核糖体是细胞最基本的不可缺少的重要结构,其唯一的功能是按照 mRNA 的指令由氨基酸高效且精确地合成多肽链。

核糖体是一种没有被膜包裹的颗粒状结构,其主要成分是蛋白质(称 r 蛋白)和 RNA(称 rRNA)。r 蛋白主要分布在核糖体的表面,而 rRNA 则位于核糖体的内部,二者靠共价键结合在一起。核糖体在细胞内以两种状态存在:一种是附着在内质网表面的核糖体,称为附着核糖体;另一种是游离状态分布在细胞质基质中的核糖体,称为游离核糖体。两种状态的核糖体所合成的蛋白质种类不同,但它们的结构和化学组成却完全相同。

核糖体有两种基本类型:一种是 70*S* 的核糖体,主要存在于原核细胞中;另一种是 80*S* 的核糖体,存在于所有真核细胞中(线粒体和叶绿体除外)。不论是 70*S* 或 80*S* 的核糖体,均由大小不同的两个亚单位构成。核糖体大小亚单位常游离于胞质中,只有当小亚单位与 mRNA 结合后大亚单位才与小亚单位结合形成完整的核糖体。肽链合成终止后,大小亚单位解离,重又游离于胞质中。

核糖体的装配是一个自我装配的过程。研究表明,不同细胞中的核糖体可能来源于一个共同的祖先,在进化上是非常保守的。

核糖体在细胞内不是单个独立地执行功能,而是由多个甚至几十个核糖体串连在一条 mRNA 分子上构成多聚核糖体,高效地进行肽链的合成。每种多聚核糖体所含核糖体的数量是由 mRNA 的长度决定的,蛋白质的合成是以多聚核糖体的形式进行的,这可大大提高多肽合成速度。原核细胞与真核细胞在合成蛋白质上的主要区别之一是,原核细胞由 DNA 转录 mRNA 和由 mRNA 翻译成蛋白质是同时并几乎在同一部位进行;而真核细胞的 DNA 转录在核内,蛋白质的合成在胞质。

核糖体的活性部位约占其结构成分的三分之二,远高于一般酶的活性中心,其最主要的活性部位是 A 位点、P 位点、E 位点和肽酰转移酶的催化中心。人们长期以来积累的关于核糖体 rRNA 和各种 r 蛋白的三维结构及其与核糖体活性部位关系的知识,特别是对 L11－rRNA 复合物晶体结构的分析,将为最终揭开核糖体这一古老而复杂、精巧而高效的“微机”的运转打下基础。

生命是自我复制的体系,推测最早出现的简单生命体中的生物大分子,应是既具有信息载体功能又具有酶的催化功能,因此,RNA 可能是生命起源中最早的生物大分子。

思　考　题

1. 以 80*S* 核糖体为例,说明核糖体的结构成分及其功能。
2. 已知核糖体上有哪些活性部位? 它们在多肽合成中各起什么作用?
3. 何谓多聚核糖体? 以多聚核糖体的形式行使功能的生物学意义是什么?
4. 试比较原核细胞与真核细胞的核糖体在结构组分及蛋白质合成上的异同点。

5. 你认为最早出现的简单生命体中的生物大分子是什么？为什么？

参考文献

1. Alberts. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing, Inc., 1998

2. Benjamin Lewin. Gene(Ⅵ).Oxford: Oxford University Press, 1997

3. Harry F Noller. Ribosomal RNA and Translantion. *Annu. Rev. Biochem*, 1991(60):191 - 227

4. Harry F Noller, Vernita Hoffarth, and Ludwika Zimniak. Unusual Resistance of Peptidyl Transferase to Protein Extraction Procedures. *Science*, 1992(256):1 416 ~ 1 419

5. B T Porse, Roger A Garrett. Ribosomal Mechanics, Antibodies and GTP Hydrolysis. *Cell*, 1999(97)423 ~ 426

第十章

细胞骨架

细胞骨架(cytoskeleton)是指真核细胞中的蛋白纤维网架体系。最初,人们认为细胞质中的基质是均质无结构的,但许多重要的生命现象,诸如细胞运动及细胞形态的维持等,难以得到解释。1928年,Klotzoff提出了细胞骨架的原始概念。但以往电镜制样一般采用锇酸或高锰酸钾低温(0～4℃)固定细胞,骨架大多被破坏。直到1963年,采用戊二醛常温固定方法,在细胞中发现微管后,才逐渐认识到细胞骨架的存在。

继在真核细胞中发现微丝(microfilament)、微管(microtubule)和中间纤维(intermediate filament)细胞质骨架体系之后,近年来又发现在真核细胞的细胞核中存在另一骨架体系,即核骨架－核纤层体系。核骨架或核基质(nuclear matrix,nucleoskeleton,karyoskeleton)、核纤层(nuclear lamina)与中间纤维在结构上相互连接,形成贯穿于细胞核和细胞质的网架体系。

细胞骨架的概念正在不断发展之中,早期的细胞骨架仅指微丝和微管。目前,狭义的细胞骨架指细胞质骨架,包括微丝、微管、中间纤维;广义的细胞骨架包括细胞核骨架、细胞质骨架、细胞膜骨架和细胞外基质。细胞骨架的研究是当前细胞生物学中最为活跃的领域之一,近年来发现细胞骨架不仅在维持细胞形态,保持细胞内部结构的有序性中起重要作用,而且与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分裂、基因表达、细胞分化等生命活动密切相关。细胞骨架的研究使人们对生命活动的基本单位——细胞的结构和功能有了新的认识。

目前,细胞骨架的研究已从形态观察为主迅速推进到分子水平,骨架蛋白及骨架结合蛋白的分离、纯化、鉴定、测序及结构分析、基因表达调节、骨架纤维的装配动态及功能分析成为细胞骨架研究的重要内容。绿色荧光蛋白的应用,为研究活细胞骨架的结构及其行使功能中的动态变化开辟了一条新的途径。细胞骨架的研究是从分子水平研究亚细胞结构装配及其功能的突出范例。现在已开始将分子行为与细胞行为,分子结构与细胞功能的研究结合起来,研究表明一种或几种生物大分子即能自装配成骨架纤维网络这样一种亚细胞结构,并能参与完成诸如细胞运动、物质运输、细胞分裂等如此复杂的生命活动。细胞骨架的研

究为“生物大分子怎样自装配为生命体”这一生物学基本问题提供了一个例证。

第一节　细胞质骨架

一、微丝

微丝(microfilament,MF),又称肌动蛋白纤维(actin filament),是指真核细胞中由肌动蛋白(actin)组成,直径为 7 nm 的骨架纤维。

(一) 成分

肌动蛋白是微丝的结构成分,相对分子质量为 43×10^3。肌动蛋白单体外观呈哑铃状,其三维结构见图 10-1 A。肌动蛋白存在于所有真核细胞中,肌动蛋白在真核细胞进化过程中高度保守,在哺乳动物和鸟类细胞中至少已分离到 6 种肌动蛋白,4 种称为 α 肌动蛋白,分别为横纹肌、心肌、血管平滑肌和肠道平滑肌所特有,另两种为 β 肌动蛋白和 γ 肌动蛋白,见于所有肌肉细胞和非肌肉细胞胞质中。不同类型肌肉细胞的 α 肌动蛋白分子一级结构(约 400 个氨基酸残基)仅相差 4~6 个氨基酸残基,β 肌动蛋白或 γ 肌动蛋白与 α 横纹肌肌动蛋白相差约 25 个氨基酸残基。显然这些肌动蛋白基因是从同一个祖先基因进化而来。多数简单的真核生物,如酵母或粘菌,含单个肌动蛋白基因,仅合成一种肌动蛋白,然而,许多多细胞真核生物含有多个肌动蛋白基因,如海胆有 11 个,网柄菌属(*Dictyostelium*)有 17 个,在某些植物中有 60 个。

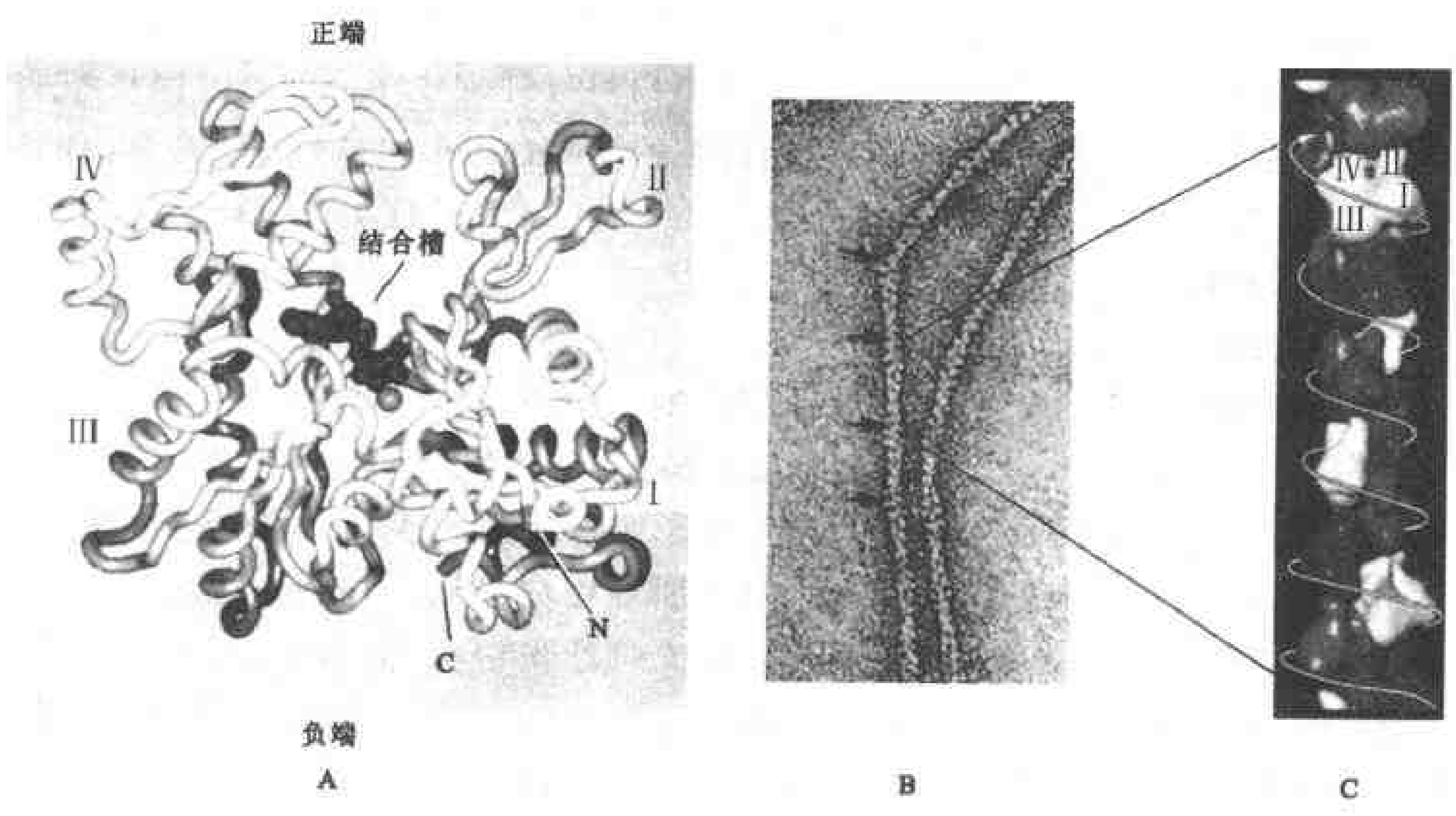


图 10-1　肌动蛋白三维结构与肌动蛋白纤维

A: 肌动蛋白单体三维结构,一分子 ATP 和 Ca^{2+} 结合于分子中间核苷结合槽(nucleutide - binding cleft);B: 肌动蛋白纤维电镜照片;C: 肌动蛋白纤维分子模型(引自 Harvey Lodish,1995)

(二) 装配

微丝,亦称为纤维形肌动蛋白(F - actin),是由球形肌动蛋白(G - actin)单体形成的多聚体(图 10 - 1 A,B,C)。肌动蛋白单体具有极性,装配时呈头尾相接,故微丝也具有极性。比较传统的模型认为微丝是由两条肌动蛋白单链螺旋盘绕形成的纤维,近年来则认为微丝是由一条肌动蛋白单体链形成的螺旋,每个肌动蛋白单体周围都有 4 个亚单位,呈上、下及两侧排列(图 10 - 1 B,C)。

在含有 ATP 和 Ca^{2+} 以及低浓度的 Na^+、K^+ 等阳离子溶液中,微丝趋于解聚成 G - actin;而在 Mg^{2+} 和高浓度的 Na^+,K^+ 溶液诱导下,G - actin 则装配为纤维状肌动蛋白,新的 G - actin 加到微丝末端,使微丝延伸。G - actin 可以加到微丝两端,但(+)极装配的速度较(-)极快,在一定条件下,微丝可以表现出一端因加亚单位而延长,而另一端因亚单位脱落而减短,这种现象称为踏车现象(tread milling)。微丝在结构上的极性对行使其功能也是必要的。肌动蛋白可在体外装配成微丝,其结构与细胞中分离的微丝相同,可以通过聚合 - 解聚纯化微丝。

在体内,有些微丝是永久性的结构,如肌肉中的细丝及肠上皮细胞微绒毛中的轴心微丝等;有些微丝是暂时性的结构,如胞质分裂环中的微丝。血小板激活及无脊椎动物精子细胞顶体反应中的微丝只有在需要时方进行装配。实际上,在大多数非肌肉细胞中,微丝是一种动态结构,持续进行装配和解聚,并与细胞形态维持及细胞运动有关。体内肌动蛋白的装配在两个水平上受到结合蛋白的调节:① 游离肌动蛋白单体的浓度;② 微丝横向连接成束或成网的程度。细胞内许多微丝结合蛋白参与调节肌动蛋白的装配。

(三)微丝结合蛋白

微丝系统的主要组分是肌动蛋白纤维。此外,还包括许多微丝结合蛋白(microfilament-associated protein)。肌动蛋白可以装配成不同的微丝网络结构,参与细胞内各种生命活动。肌动蛋白纤维的不同存在形式与微丝结合蛋白的种类有关。微丝结合蛋白参与形成微丝纤维高级结构,对肌动蛋白纤维的动态装配有调节作用,以行使特定的功能。

1. 肌肉收缩系统中的有关蛋白

肌球蛋白(myosin):约占肌肉总蛋白的一半,相对分子质量为 450×10^3,含 4 条多肽链(2 条重链,2 条轻链),两股重链盘绕成双股 α 螺旋,长约 140 nm,直径 2 nm。可用蛋白水解酶将肌球蛋白分子切断,胰蛋白酶处理产生轻酶解肌球蛋白(light meromyosin,LMM)和重酶解肌球蛋白(heavy meromyosin,HMM)。重酶解肌球蛋白经木瓜蛋白酶处理,形成肌球蛋白头部(HMM - S1)和杆部(HMM - S2)(图 10 - 2),这种肌球蛋白头部具 ATP 酶活力,构成粗丝的横桥,是与肌动蛋白分子结合的位置(图 10 - 3)。目前已发现十多种肌球蛋白,Ⅱ型肌球蛋白的主要功能是参与肌丝滑动。常见的还有Ⅰ型和Ⅴ型肌球蛋白,参与细胞骨架和细胞膜的相互作用,如膜泡运输等。

原肌球蛋白(tropomyosin,Tm):在肌肉中占总蛋白的 5% ~10%,相对分子

质量为 64×10^3，分子长度为 40 nm，由两条平行的多肽链形成 α 螺旋构型，原肌球蛋白位于肌动蛋白螺旋沟内，一个 Tm 分子的长度相当于 7 个肌动蛋白（图 10－4）。原肌球蛋白结合于细肌丝，调节肌动蛋白与肌球蛋白头部的结合。

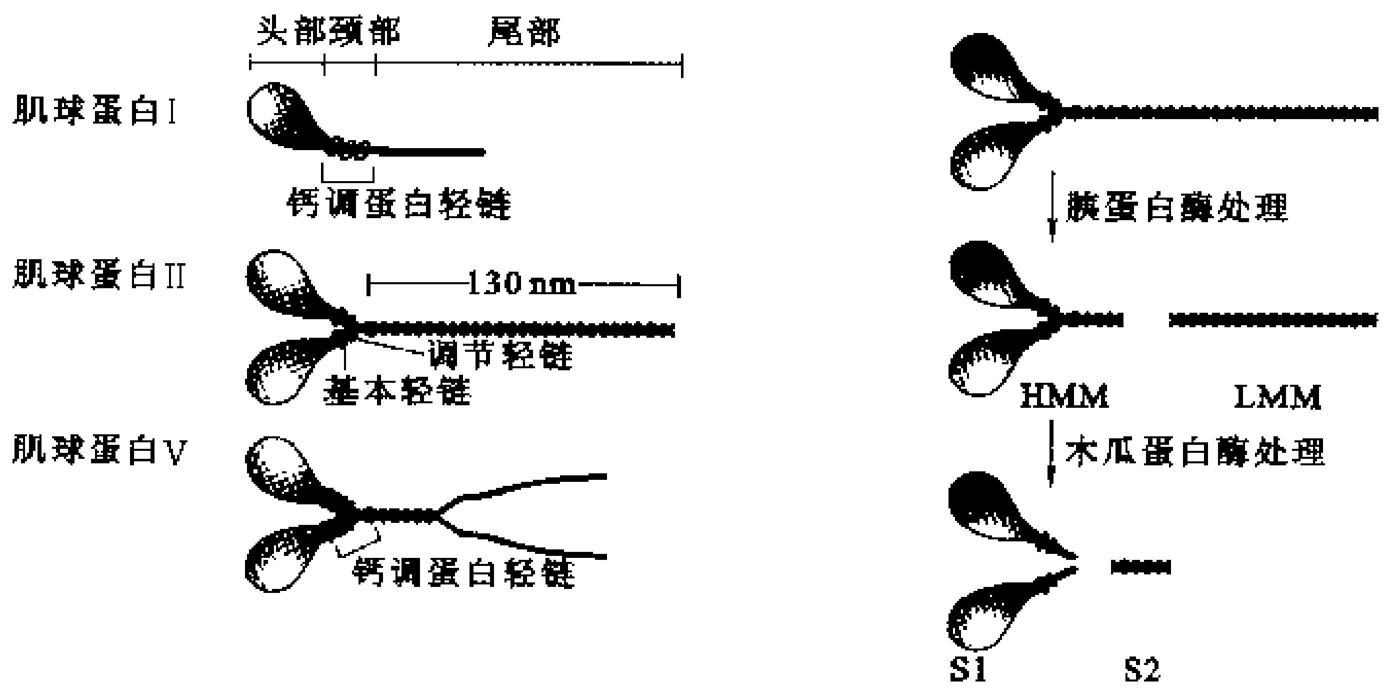


图 10－2　A：几种常见的肌球蛋白分子结构示意图；B：Ⅱ型肌球蛋白经胰蛋白酶水解成杆状轻酶解肌球蛋白（LMM）和重酶解肌球蛋白（HMM），重酶解肌球蛋白经木瓜蛋白酶水解形成肌球蛋白头部（S1）和杆部（S2）

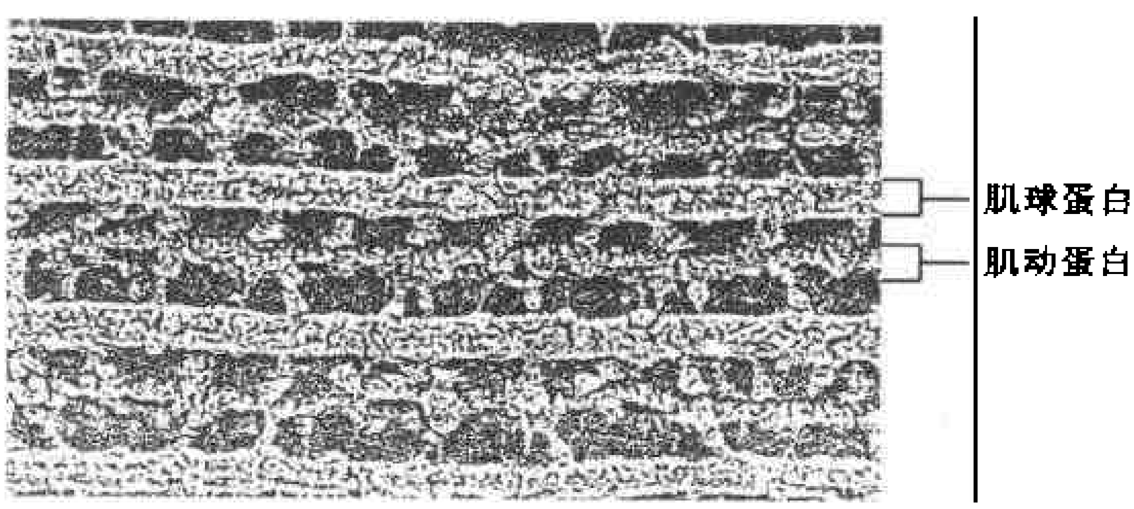


图 10－3　快速冷冻深度蚀刻电镜技术显示骨骼肌细胞中肌球蛋白与肌动蛋白间的横桥（引自 Heuser）

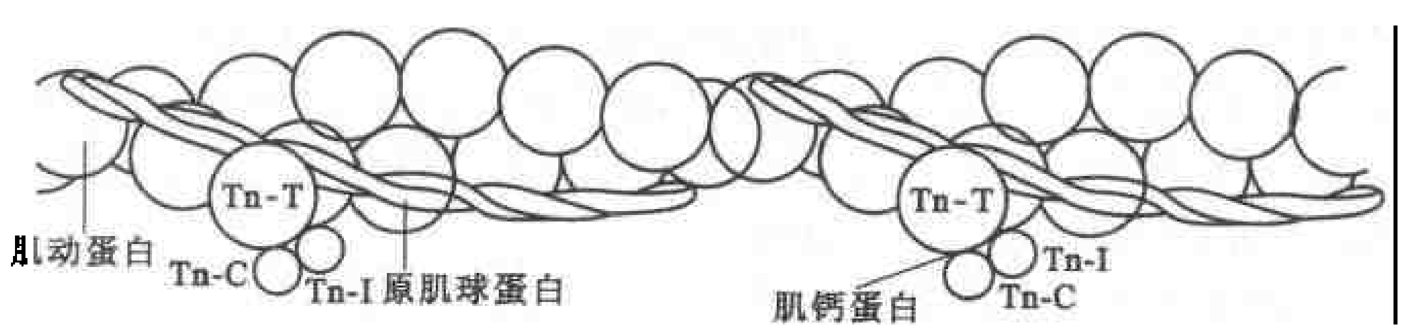


图 10－4　细肌丝的分子结构

肌钙蛋白(troponin,Tn):相对分子质量为 80×10^3,含 3 个亚基,肌钙蛋白 C(Tn－C)特异与 Ca^{2+} 结合;肌钙蛋白 T(Tn－T)与原肌球蛋白有高度亲和力;肌钙蛋白 I(Tn－I)抑制肌球蛋白 ATPase 的活性。细肌丝中每隔 40 nm 有一个肌钙蛋白复合体结合到原肌球蛋白上(图 10－4,图 10－5)。

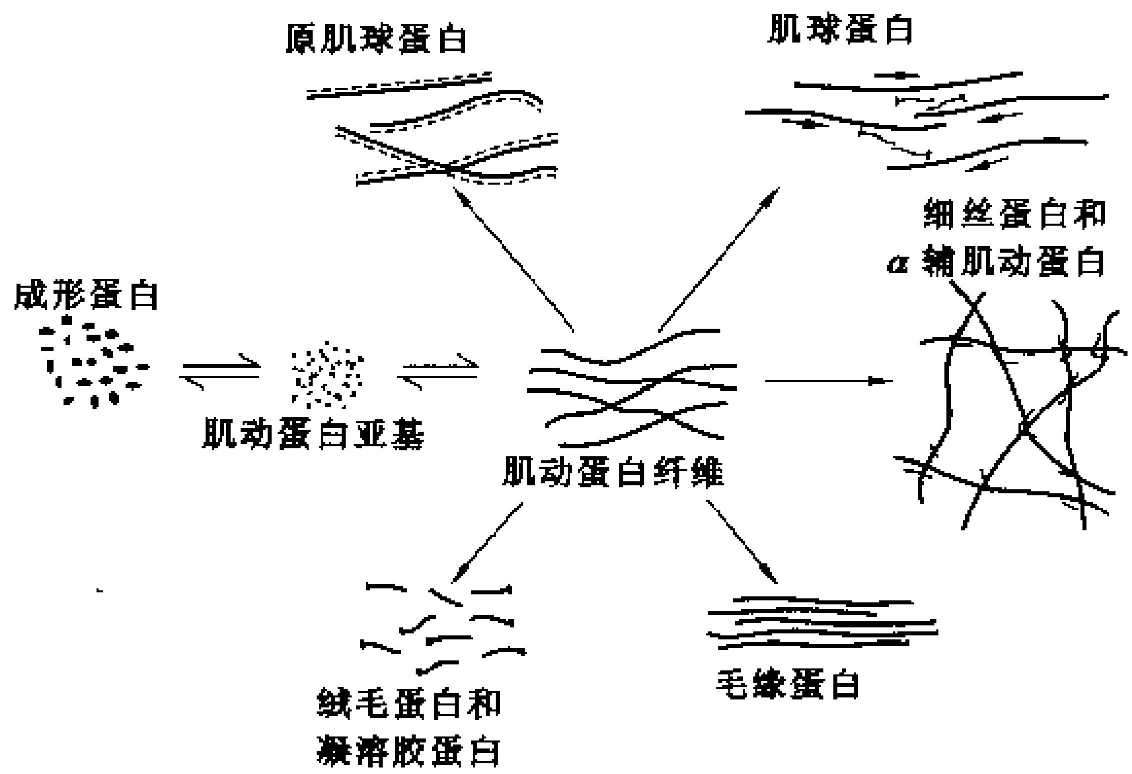


图 10－5 微丝结合蛋白功能示意图
(引自 Weber & Osborn,1985)

除上述主要分子外,肌肉收缩系统中还存在一些其他蛋白。将肌动蛋白纤维锚定于 Z 线或质膜的蛋白有:① CapZ,由相对分子质量为 32×10^3 和 36×10^3 两个亚基构成,定位于肌细胞 Z 线,结合于肌动蛋白纤维(＋)极,阻止肌动蛋白纤维(＋)极的解聚,使肌动蛋白纤维保持稳定;② α 辅肌动蛋白(α－actinin),相对分子质量为 200×10^3,是骨骼肌 Z 盘、平滑肌细胞质板及心肌闰盘主要组分之一,可横向连接微丝形成束;③ 纽蛋白(vinculin),相对分子质量为 116×10^3,见于平滑肌细胞质板、心肌闰盘,介导微丝结合于细胞膜。

肌小节中起结构作用的蛋白还有:① 肌联蛋白(connectin):相对分子质量可能大于 $1\,000\times10^3$,1 μm 长,具有弹性,连接 Z 盘与肌球蛋白纤维,在肌肉收缩或舒张时将肌球蛋白纤维定位于肌小节中央;② 伴肌动蛋白(nebulin):占肌肉总蛋白 3%,从 Z 盘伸出,与肌动蛋白纤维伴行,可能参与调节肌动蛋白纤维的装配;③ 肌营养不良蛋白(dystrophin):相对分子质量为 400×10^3,占肌肉总蛋白 0.002%,确切功能不清楚,可能参与将肌动蛋白纤维锚定于质膜。dystrophin 对防止肌纤维退化是重要的。

2. 非肌肉细胞中的微丝结合蛋白

非肌肉细胞中亦存在肌球蛋白、原肌球蛋白、α 辅肌动蛋白等;而肌钙蛋白在非肌肉细胞中尚未发现。近年来在非肌肉细胞中分离鉴定了几十种微丝结合蛋白,与微丝装配及功能有密切关系。现简述如下(表 10－1):

表 10-1 微丝结合蛋白

蛋白	相对分子质量/10^3	功能
110K 蛋白 (110K protein, myosin I)	110	肌球蛋白,从肌动蛋白纤维侧向连接 微绒毛细胞膜,在运动细胞的前沿产生动力
α 辅肌动蛋白 (α actinin)	200	参与微丝与膜的结合,可横向连接微丝形成束,在肌节中具结构作用
钙调蛋白 (calmoldulin)		低 Ca^{2+} 条件下与原肌球蛋白及肌动蛋白结合,阻止肌球蛋白的结合
封端蛋白 (capping protein)		结合于纤维一端,阻止肌动蛋白单体的增加或减少
cofilin		与肌动蛋白单体或肌动纤维结合,促使肌动蛋白纤维的解聚
细丝蛋白 (filamin)	两个 270 亚基	横向连接相邻微丝,形成三维网络结构
毛缘蛋白 (fimbrin)		在平行微丝之间形成紧密的连接,形成微丝束 血影蛋白,横向连接相邻微丝
截断蛋白 (fragmin, serverin)	42 40	低等真核细胞中分离,一定条件下,将微丝切断
凝溶胶蛋白 (gelsolin)	90	高 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}] > 1\ \mu mol/L$)时将长微丝切成片段,使肌动蛋白由凝胶态向溶胶态转化
成形蛋白 (profilin)	12~15	见于从酵母到人所有真核细胞中,结合 G 肌动蛋白单体形成肌动蛋白-成形蛋白复合体,阻断肌动蛋白纤维装配
血影蛋白 (spectrin)	240(α) 220(β)	红细胞膜骨架的主要组分之一,相邻微丝间横向连接
talin	235	见于细胞粘着斑,与细胞粘着有关
绒毛蛋白(villin)	95	见于微绒毛中,一种 Ca^{2+} 调微丝结合蛋白,低 Ca^{2+} 时促进形成微丝装配核心,形成微丝束;高 Ca^{2+} 时将长微丝切成片段,在微绒毛的发生中可能起关键作用
纽蛋白 (vinculin)	116	在细胞连接和细胞粘着部位富集,通过结合于 α 辅肌动蛋白,介导微丝结合于细胞膜

(四) 微丝特异性药物

细胞松弛素(cytochalasins)是真菌的一种代谢产物,可以切断微丝,并结合在微丝末端阻抑肌动蛋白聚合,但对解聚没有明显影响,因而可以破坏微丝的三维网络。

鬼笔环肽(philloidin)是一种由毒蕈(*Amanita phallodies*)产生的双环杆肽,与微丝有强亲合作用,使肌动蛋白纤维稳定,抑制解聚,且只与 F 肌动蛋白结合,而不与 G 肌动蛋白结合,荧光标记的鬼笔环肽可清晰地显示细胞中的微丝。

(五) 微丝性细胞骨架的功能

真核细胞中,肌动蛋白在微丝结合蛋白的协同下,形成独特的微丝性骨架结构,与细胞中许多重要的功能活动有关,如肌肉收缩、变形运动、胞质分裂等;近年来发现微丝骨架网络系统与细胞信号传递有关,有些微丝结合蛋白,如纽蛋白等,是蛋白激酶及癌基因产物的作用底物;多聚核糖体及蛋白质合成与微丝的关系亦开始受到关注;微丝与细胞膜形态的维持及与膜骨架的关系见第四章。

1. 肌肉收缩

在生物所表现的种种运动形式中，以肌肉收缩最为人们熟知。而收缩装置是如此高度有序，使人们能从分子水平直至器官功能水平对其进行详细了解。肌肉收缩机制的研究是从分子水平研究细胞、组织、器官的结构与功能的成功范例，说明生物的结构组装和功能运作都是生物体内的分子活动所致。

骨骼肌的超微结构见图 10－6，组织学中已有详尽阐述，这里不再赘述。

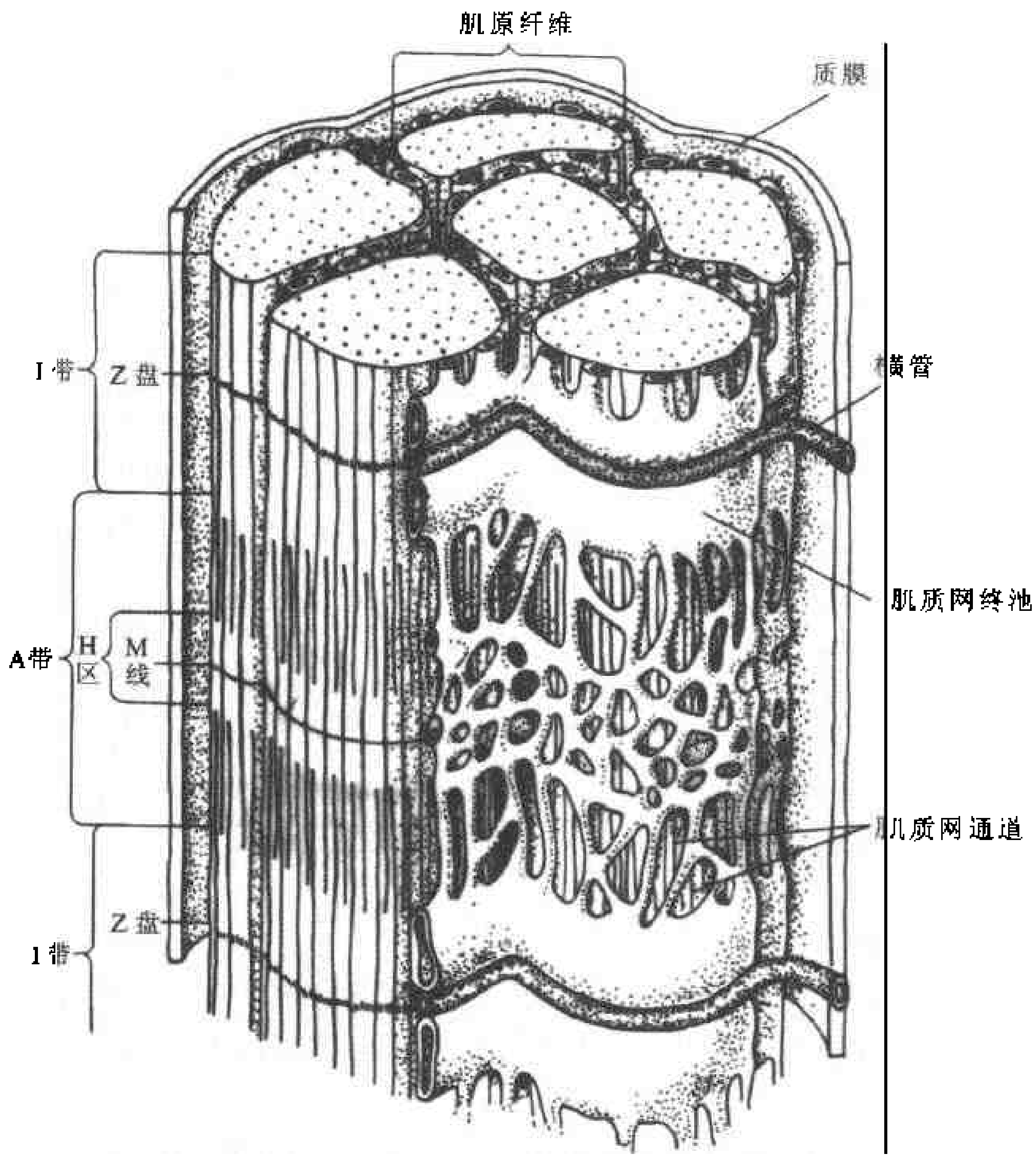


图 10　6　骨骼肌结构模式图

每个肌细胞或肌纤维(myofiber)含有多根肌原纤维，两个 Z 盘间的肌小节是肌肉收缩的功能单位

骨骼肌细胞的收缩单位是肌原纤维(myofibrils)，肌原纤维由粗肌丝和细肌丝装配形成，粗肌丝的成分是肌球蛋白，细肌丝的主要成分是肌动蛋白，辅以原肌球蛋白和肌钙蛋白。肌小节基本结构见图 10－7。

肌肉收缩系由肌动蛋白丝与肌球蛋白丝的相对滑动所致。由神经冲动诱发的肌肉收缩基本过程为：

(1) 动作电位的产生　来自脊髓运动神经元的神经冲动经轴突传到神经肌肉接点——运动终板，使肌肉细胞膜去极化，经 T 小管传至肌质网；

(2) Ca^{2+} 的释放　肌质网去极化后释放 Ca^{2+} 至肌浆中，有效触发收缩周期的 Ca^{2+} 阈浓度约为 10^{-6} mol/L；

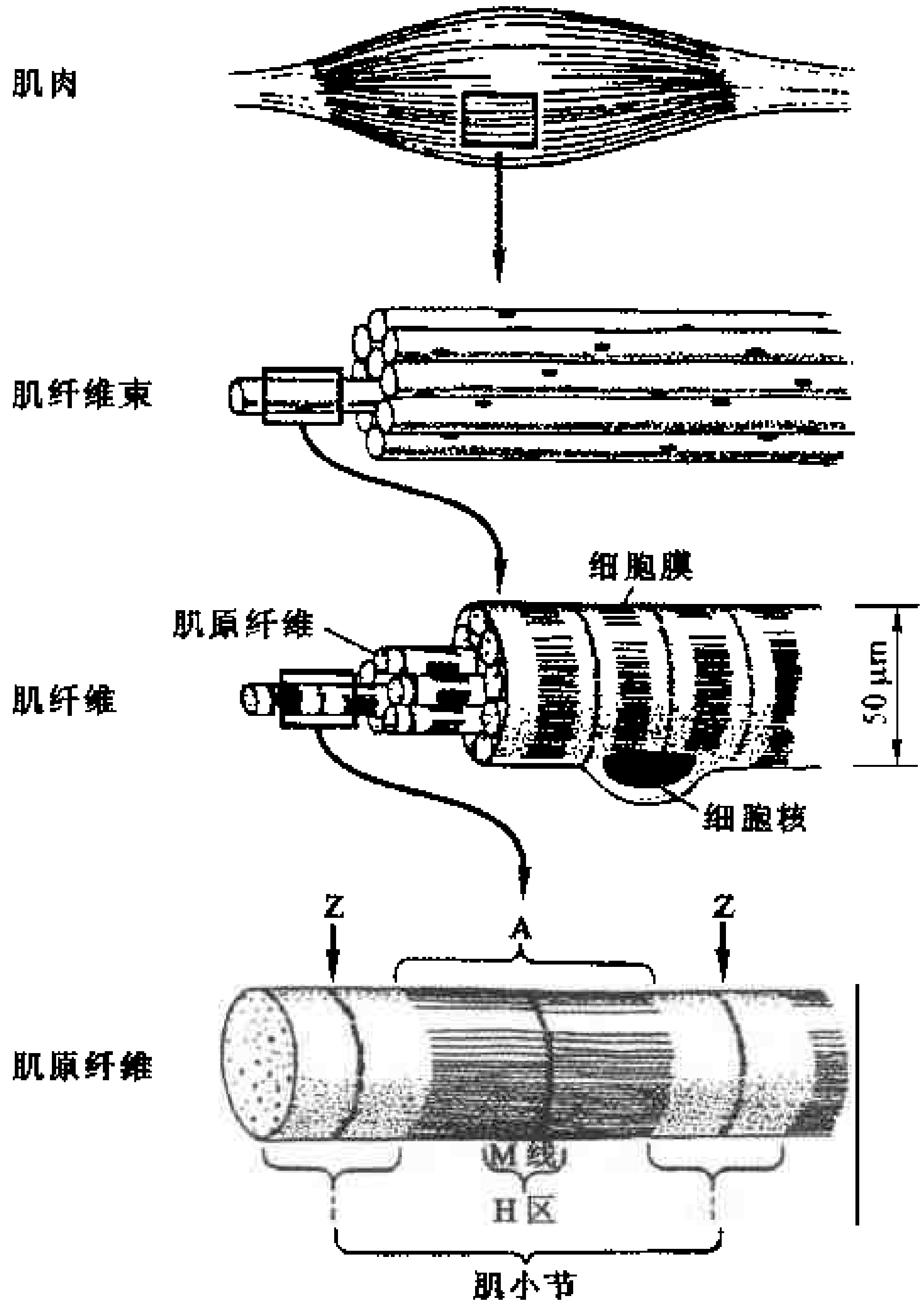


图 10－7　肌纤维的三维结构模式图

(3) 原肌球蛋白位移　Ca^{2+} 与 TnC 结合，引起构象变化，TnC 与 TnI、TnT 结合力增强，TnI 与肌动蛋白结合力削弱，使肌动蛋白与 TnI 脱离，变成应力状态；同时，TnT 使原肌球蛋白移动到肌动蛋白双螺旋沟的深处，消除肌动蛋白与肌球蛋白结合的障碍；

(4) 肌动蛋白丝与肌球蛋白丝的相对滑动　肌动蛋白附着到肌球蛋白头部(图 10－8，步骤 3)。肌球蛋白头部是一种为肌动蛋白所活化的 ATP 酶，与肌动蛋白的结合引起肌球蛋白头部朝着肌球蛋白细丝弯曲。同时释放 ADP＋Pi 和能量(图 10－8，步骤 4)，弯曲后的肌球蛋白头部能结合 ATP，从而与肌动蛋白分开(图 10－8，步骤 1)，肌球蛋白一旦释放即恢复原来的构型(图 10－8，步骤 2)。结果造成细丝和粗丝间的滑动，表现为 ATP 水解和肌肉收缩。如果仍有

Ca^{2+}存在，肌球蛋白将继续下一个周期，沿肌动蛋白细丝滑动；

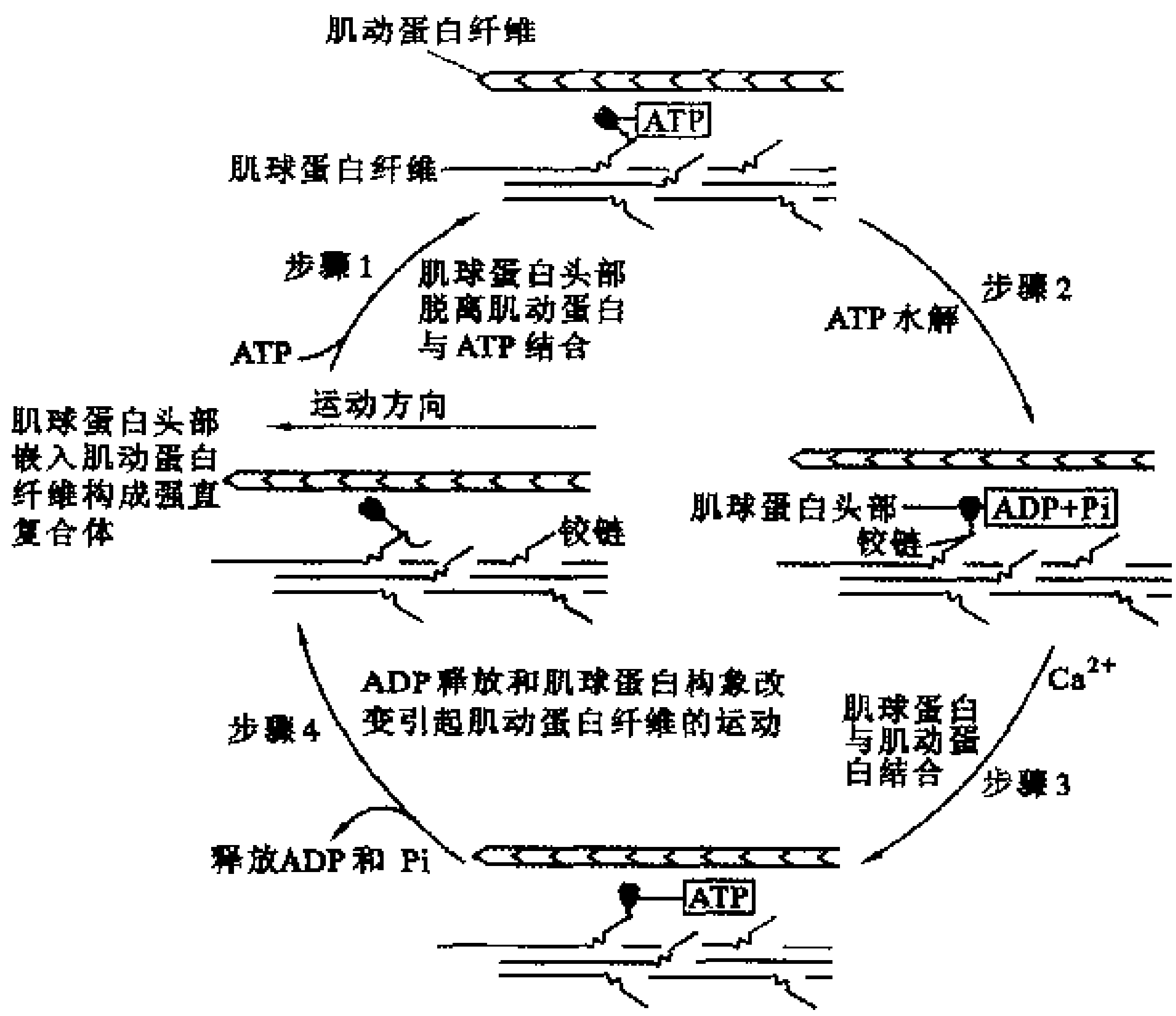


图 10－8　肌肉收缩过程图解

1．弯曲后的肌球蛋白头部结合 ATP，减弱肌动蛋白与肌球蛋白的结合，进而导致肌球蛋白与肌动蛋白分开；2．ATP 水解为 ADP＋Pi，但水解产物仍结合于肌球蛋白，产生一获能的肌球蛋白头部，发生旋转，垂直于肌动蛋白纤维；3．在依赖于 Ca^{2+} 的条件下，肌球蛋白头部结合于相邻的肌动蛋白纤维；4．肌球蛋白头部发生构象变化，与肌动蛋白纤维成 45°角，拉动肌动蛋白纤维导致肌动蛋白纤维相对于肌球蛋白的滑动，在此过程中 Pi 和 ADP 相继释放（引自 Eisenberg & Hill，1985）

(5) Ca^{2+}的回收　到达肌肉细胞的一系列冲动一经停止，肌质网就通过主动运输重吸收 Ca^{2+}，于是收缩周期停止。

2．微绒毛

肠上皮细胞微绒毛（microvilli）的轴心微丝是非肌肉细胞中高度有序微丝束的代表，微丝是同向平行排布，微丝束下端终止于端网结构（terminal web）。微绒毛中心的微丝束起维持微绒毛形状的作用，其中不含肌球蛋白、原肌球蛋白和 α 辅肌动蛋白，因而无收缩功能。微丝结合蛋白如绒毛蛋白、110K 蛋白、毛缘蛋白、fodrin 在微丝束的形成、维持及与微绒毛细胞膜连接中起重要作用（图 10－9）。

3．应力纤维

应力纤维（stress fiber）是真核细胞中广泛存在的微丝束结构。电镜观察表明，应力纤维由大量平行排列的微丝组成，其成分为肌动蛋白、肌球蛋白、原肌球

蛋白和 α 辅肌动蛋白。应力纤维与细胞间或细胞与基质表面的粘着有密切关系。应力纤维可能在细胞形态发生、细胞分化和组织的形成等方面具有重要作用。

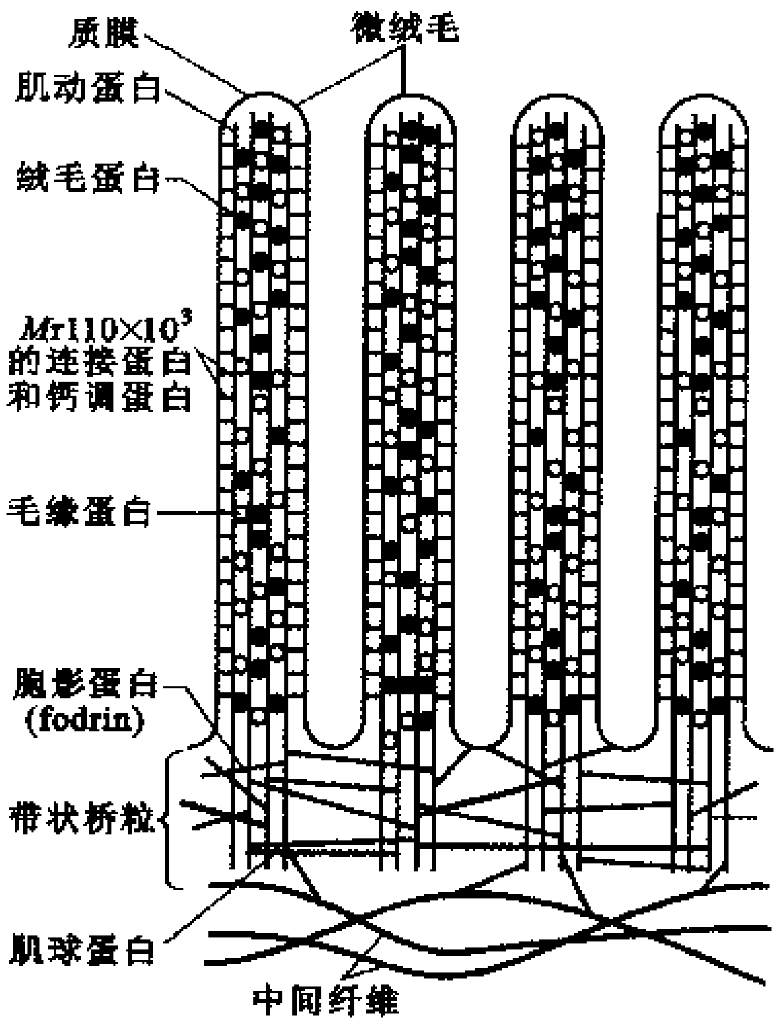


图 10-9 肠上皮细胞微绒毛结构模式图

微丝被毛缘蛋白和绒毛蛋白聚集成束，110 蛋白和钙调蛋白形成 20～30 nm 的横桥，肌球蛋白和 fodrin 连接相邻微丝束，并将微丝束与膜连接起来

4. 溶胶层和阿米巴运动

许多细胞中，细胞膜下有一层富含肌动蛋白纤维的区域，称为溶胶。这些肌动蛋白纤维平行于质膜排列，并与膜有连接。这一纤维网络可以为细胞膜提供强度和韧性，维持细胞形状。细胞的多种运动，如胞质环流（cyclosis）、阿米巴运动（amoiboid）、变皱膜运动（ruffled membrane locomotion）及吞噬（phagocytosis）都与肌动蛋白的溶胶与凝胶状态及其相互转化有关。这些运动能为细胞松弛素所抑制。

5. 胞质分裂环

有丝分裂末期，两个即将分裂的子细胞之间产生一个收缩环。研究表明，收缩环是由大量平行排列的微丝组成，由分裂末期胞质中的肌动蛋白装配而成。随着收缩环的收缩，两子细胞被分开。胞质分裂后，收缩环即消失。收缩环是非肌肉细胞中具有收缩功能的微丝束的典型代表，在很短的时间内，微丝能迅速装配与去装配以完成细胞功能，其收缩机制亦是肌动蛋白和肌球蛋白的相对滑动。

二、微管

微管(microtubule)是存在于所有真核细胞中由微管蛋白(tubulin)装配成的长管状细胞器结构,平均外径为24 nm(图10－10),通过其亚单位的装配和去装配能改变其长度,对低温、高压和秋水仙素等药物敏感。细胞内微管呈网状或束状分布,并能与其他蛋白共同装配成纺锤体、基粒、中心粒、鞭毛、纤毛、轴突、神经管等结构,参与细胞形态的维持、细胞运动和细胞分裂。

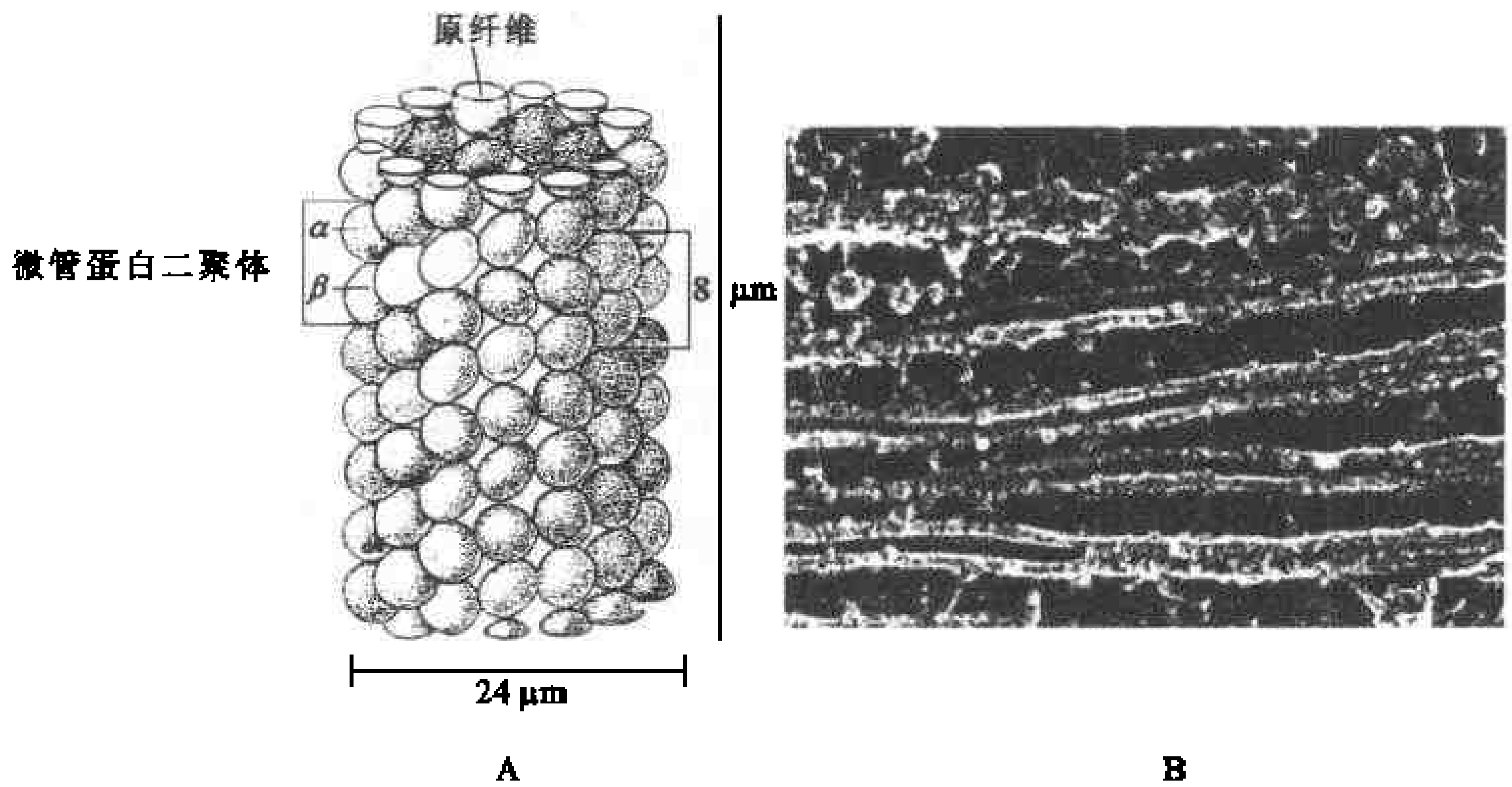


图10－10　微管结构示意图
A:微管模式图(引自Amos等,1976);B:微管电镜照片(陈建国)

(一)成分

微管由两种类型的微管蛋白亚基,即α微管蛋白和β微管蛋白组成,α微管蛋白含450个氨基酸残基,其相对分子质量为50×10^3,β微管蛋白含455个氨基酸残基,α和β微管蛋白均含酸性C端序列。除极少数例外,如人的红细胞,微管几乎存在于从阿米巴到高等动植物所有真核细胞胞质中,而所有原核生物中没有微管。微管蛋白分子在生物进化上可能是最稳定的蛋白分子之一。最近,微管蛋白三维结构研究取得突破性进展,采用结晶电子显微学方法研究了微管蛋白异二聚体的三维结构,对从分子水平阐述微管的装配与调节,微管蛋白与引擎蛋白之间的相互作用有深远影响。α微管蛋白和β微管蛋白形成微管蛋白异二聚体,是微管装配的基本单位。微管蛋白二聚体含有鸟嘌呤核苷酸的两个结合位点,二价阳离子亦能结合于微管蛋白二聚体上。此外,微管蛋白二聚体上具有一个秋水仙素结合位点,一个长春花碱结合位点。

（二）形态

微管是由微管蛋白二聚体装配成的长管状细胞器结构，平均外径为 24 nm，内径 15 nm，微管壁由 13 根原纤维排列构成，在横切面上，微管呈中空状，微管壁由 13 个球形蛋白亚基组成（图 10－10）。微管可装配成单管，二联管（纤毛和鞭毛中），三联管（中心粒和基体中）。细胞内还存在一些微管附属结构，如纤毛或鞭毛中的动力蛋白臂等，微管附属结构的功能有：① 稳定微管；② 构成微管间的连接，使微管成一定的排列；③ 使微管与其他结构，主要是膜结构相连接；④ 产生动力。

（三）装配

1. 装配过程

所有微管遵循同一原则由相似的蛋白亚基装配而成，主要装配方式是：首先，α 微管蛋白和 β 微管蛋白形成长度为 8 nm 的 αβ 二聚体，αβ 二聚体先形成原纤维（protofilament），经过侧面增加而扩展为片层，至 13 根原纤维时，即合拢形成一段微管。新的二聚体再不断加到微管的端点使之延长。最终微管蛋白与微管达到平衡（图 10－11）。

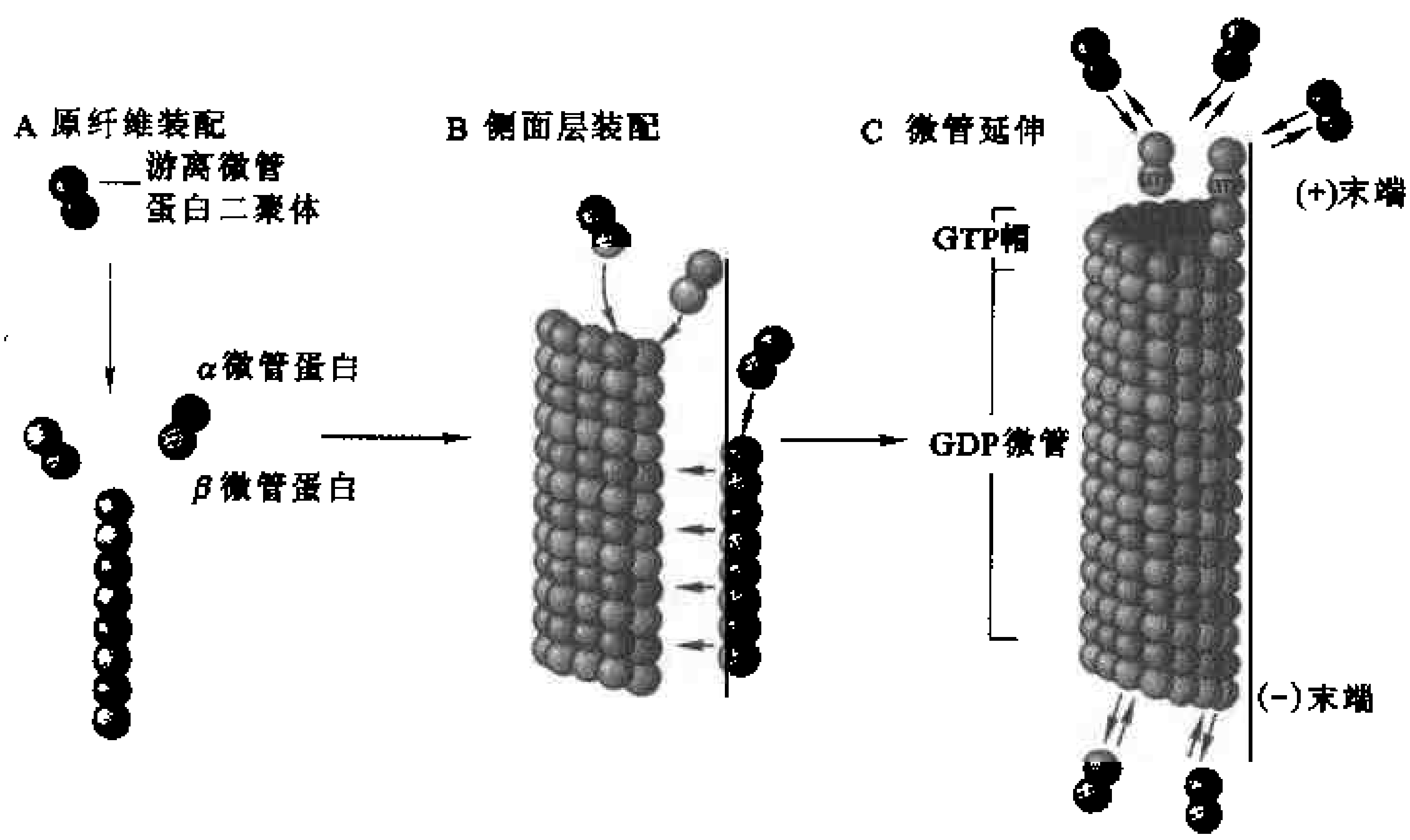


图 10－11　微管装配的过程与踏车现象

A：αβ 微管二聚体首先装配成原纤维；B：进而形成片层；C：围成由 13 根原纤维组成的微管

原纤维中重复的亚单位是 αβ 异二聚体，αβ→αβ→αβ，微管中这种亚单位排列即构成微管的极性，所有的微管都有确定的极性。微管的两个末端在结构上不是等同的，这是非常重要的结构特征。细胞内所有由微管构成的亚细胞结构也是有极性的。αβ→αβ 即为头→尾的方向，微管蛋白加上或释放主要发生于（＋）极，微管的延长主要依靠在（＋）极装配 GTP 微管蛋白，然后 GTP 水解为

GDP 或 GTP 与微管蛋白分离。目前的微管装配动态模型认为，微管两端具 GTP 帽(取决于微管蛋白浓度)，微管将继续装配，反之，具 GDP 帽则解聚。在一定条件下，微管一端发生装配使微管延长，而另一端发生去装配而使微管缩短，实际上是微管正极的装配速度快于微管负极的装配速度，这种现象称为踏车现象(tread milling)(图 10 - 11C)。

2. 体外微管装配条件

(1) 微管蛋白浓度：微管蛋白装配低于一定浓度(临界浓度)时，不发生微管聚合，临界浓度随温度和其他聚合条件的变动而异，大约为 1 mg/ml；

(2)最适 pH：pH6.9；

(3)离子：Ca^{2+} 应尽可能除去，Mg^{2+} 为装配所必需；

(4)温度：37℃微管蛋白二聚体装配成微管，0℃微管解聚为二聚体；

(5)GTP 的供应。

3. 体内微管装配动态

微管蛋白的合成是自我调节的，多余的微管蛋白单体结合于合成微管蛋白的核糖体上，导致微管蛋白 mRNA 降解。

微管在体内的装配和去装配在时间和空间上是高度有序的，间期细胞中，细胞质微管与微管蛋白亚单位库处于相对平衡状态；有丝分裂期中，胞质微管装配和去装配动态受细胞周期调控，发生显著改变，分裂前期，胞质微管网络中的微管去装配，游离的微管蛋白亚单位装配为纺锤体；分裂末期，发生逆向转变。此外，细胞中存在一些非常稳定的微管结构，如纤毛，鞭毛等。

4. 微管组织中心

微管在生理状态及实验处理解聚后重新装配的发生处称为微管组织中心(microtubule organizing center，MTOC)。动物细胞的 MTOC 为中心体。MTOC 决定了细胞微管的极性，微管的(-)极指向 MTOC，(+)极背向 MTOC。

(四) 微管相关蛋白质

现已发现有几种蛋白与微管密切相关，附着于微管多聚体上，参与微管的装配并增加微管的稳定性。然而，在实验条件下，微管蛋白可以在去除这些蛋白的情况下装配。因此这些蛋白称为微管相关蛋白质(microtubule - associated protein，MAP)。包括 MAP_1，MAP_2，MAP_4，tau 蛋白等。一般认为微管相关蛋白质与骨架纤维间的连接有关，近年来的研究显示微管结合蛋白可能具有更广泛的功能。所有不同的微管结构均由相同的 α 微管蛋白和 β 微管蛋白亚单位组成，其结构与功能的差异可能取决于所含微管相关蛋白质的不同。

τ 蛋白：是一组由同一基因编码的、相对分子质量为 55×10^3 ~ 62×10^3 的蛋白质，见于神经轴突中，具有热稳定性。其功能是加速微管蛋白的聚合，形成 18 nm 臂，横向连接相邻微管以稳定微管。

MAP_1：相对分子质量为 270×10^3 杆状分子，对热敏感，见于神经轴突和树突中，在微管间形成横桥，但并不使微管成束。① MAP_1A：见于成熟轴突中；② MAP_1B：见于新生长的轴突中；③ MAP_1C：最初认为是大脑中 5 种高相对分子

质量 MAP 之一,后来发现 MAP_1C 是一种胞质动力蛋白(dynein),与逆向的轴突运输有关。

MAP_2:仅见于树突中,在微管间及微管与中间纤维间形成横桥,能使微管成束。MAP_1 与 MAP_2 不具同源性。MAP_2 由单个基因编码,具热稳定性,与依赖于 cAMP 的蛋白激酶有高度亲和性。① MAP_2A:相对分子质量为 270×10^3,在神经元发育过程中不断增加表达;② MAP_2B:相对分子质量为 270×10^3,在神经元发育过程中表达保持恒定;③ MAP_2C:相对分子质量为 70×10^3,存在于不成熟的神经元树突中。

MAP_4:相对分子质量为 200×10^3,广泛存在于各种细胞中,具高度热稳定性。

不同的微管结合蛋白在轴突和树突中的分布,可能决定了轴突和树突的不同形态。

（五）微管特异性药物

在微管结构和功能研究中,微管特异性药物发挥了重要作用,其中秋水仙素(colchicine)是最重要的微管工具药物,用低浓度的秋水仙素处理活细胞,可立即破坏纺锤体结构,秋水仙素不像 Ca^{2+}、高压和低温等因素那样直接破坏微管,而是阻断微管蛋白装配成微管,体外重装配实验可以清晰地显示这一点。结合有秋水仙素的微管蛋白可以装配到微管末端,但阻止其他微管蛋白的加入。

紫杉酚(taxol)能促进微管的装配,并使已形成的微管稳定。同样重水(D_2O)也会促进微管装配,增加其稳定性。令人惊奇的是,由紫杉酚和重水所致的微管稳定性增加对细胞是有害的,使细胞周期停止于有丝分裂期,由此可见,为行使正常的微管功能,微管处于动态的装配和解聚状态是重要的。

（六）功能

1．维持细胞形态

维持细胞形态是最早被证实的微管功能。用秋水仙素处理细胞破坏微管,导致细胞变圆,说明微管对维持细胞的不对称形状是重要的。对于细胞突起部分,如纤毛、鞭毛、轴突的形成和维持,微管亦起关键作用。

2．细胞内运输

真核细胞内部是高度区域化的体系,细胞中物质的合成部位与功能部位往往是不同的,必须经过细胞内运输过程。神经轴突运输和鱼色素细胞中色素颗粒的运输是两个最为直观的例证,说明细胞骨架尤其是微管在细胞内物质转运中起关键性作用。

(1) 神经元轴突运输

神经元轴突中的蛋白及膜结构都是由胞体合成后转运去的,轴突运输的类型见表 10－2。

细胞骨架纤维一方面作为慢速转运的成分而经轴索运动,另一方面又充当快速转运的轨道。微管可作为高尔基体和其他小泡及颗粒运输的轨道,运速可达 2 μm/s,单根微管上的物质运输可以是双向的,神经轴突运输中两种引擎蛋

白已经得到纯化,一种是驱动蛋白(kinesin),利用 ATP 水解释放的能量向(+)极运输小泡(图 10-12);另一种是胞质动力蛋白,驱动向(-)极的运输。可在体外无细胞系统中用纯化的引擎蛋白分子模拟体内的运输过程。

表 10-2　轴突运输的类型

种　类	速　度	成　分
快速转运		
顺梯度	50~400 mm/天	膜性细胞器和物质、线粒体、突触小泡
逆梯度	200 mm/天	前溶酶体小泡、溶酶体酶、内吞小泡
慢速转运		
慢成分 b	2~8 mm/天	微丝(肌动蛋白和结合蛋白)、血影蛋白、包涵素、钙调蛋白
慢成分 a	0.2~1 mm/天	微管(微管蛋白、MAPs、tau)、神经纤维(三联体蛋白质)、血影蛋白

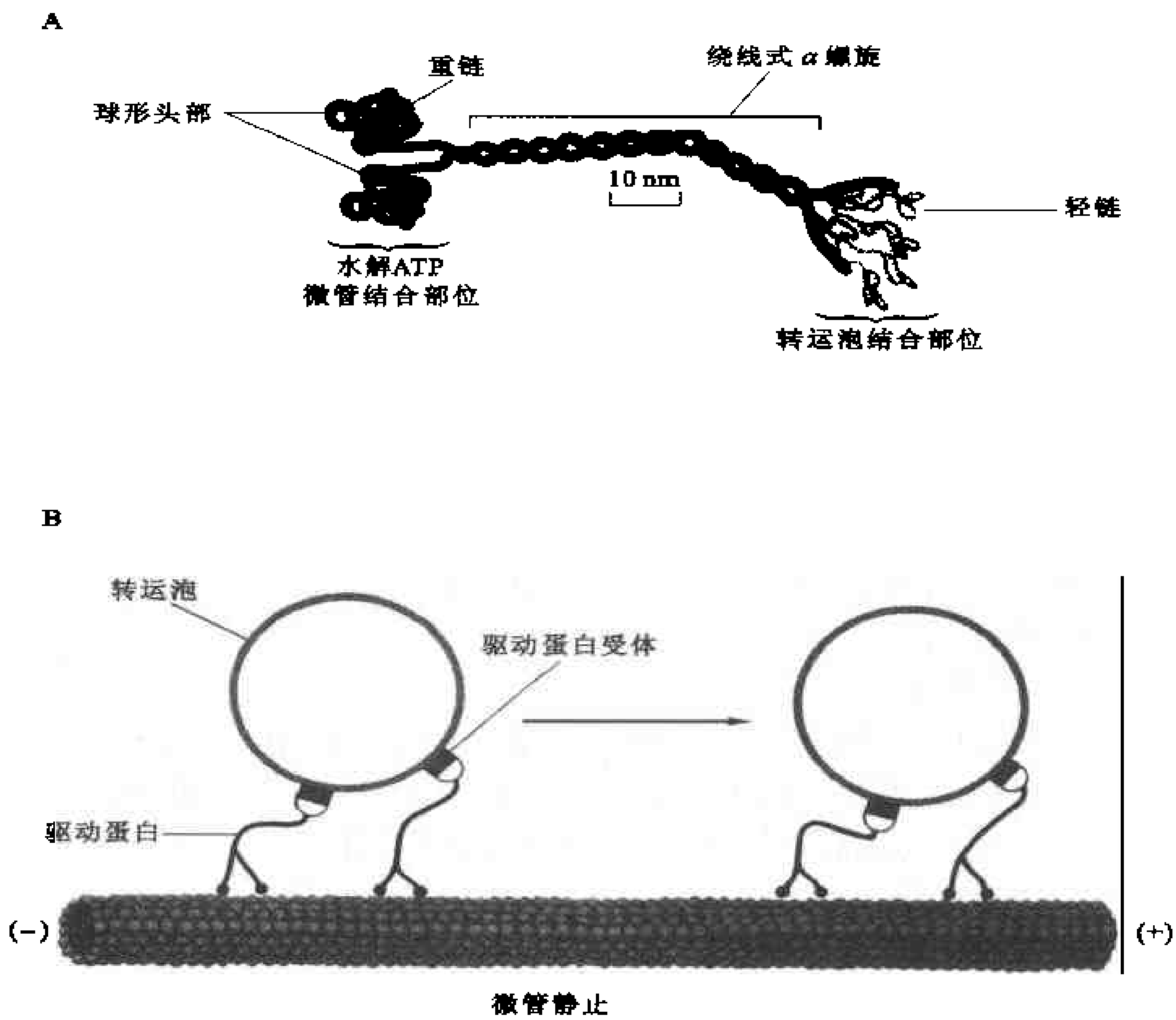


图 10-12　驱动蛋白介导的转运活动示意图

A: 驱动蛋白结构示意图,由两条重链和两条轻链组成;B: 驱动蛋白介导转运泡由微管负极向正极移动

(2) 色素颗粒的运输

许多两栖类的皮肤和鱼类的鳞片中含有特化的色素细胞,在神经肌肉控制下,这些细胞中的色素颗粒可在数秒钟内迅速分布到细胞各处,从而使皮肤颜色变黑;又能很快运回细胞中心,而使皮肤颜色变浅,以适应环境的变化。研究发现,色素颗粒实际上是沿微管而转运的。

3. 鞭毛运动和纤毛运动

纤毛(cilia)和鞭毛(flagellae)是细胞表面的特化结构,具有运动功能。纤毛和鞭毛的结构基本相同。纤毛轴心含有一束"9+2"排列的平行微管,中央微管均为完全微管,外围二联体微管由A、B亚纤维组成,A亚纤维为完全微管,由13个球形亚基环绕而成,B亚纤维仅由10个亚基构成,另3个亚基与A亚纤维共用(图10-13)。

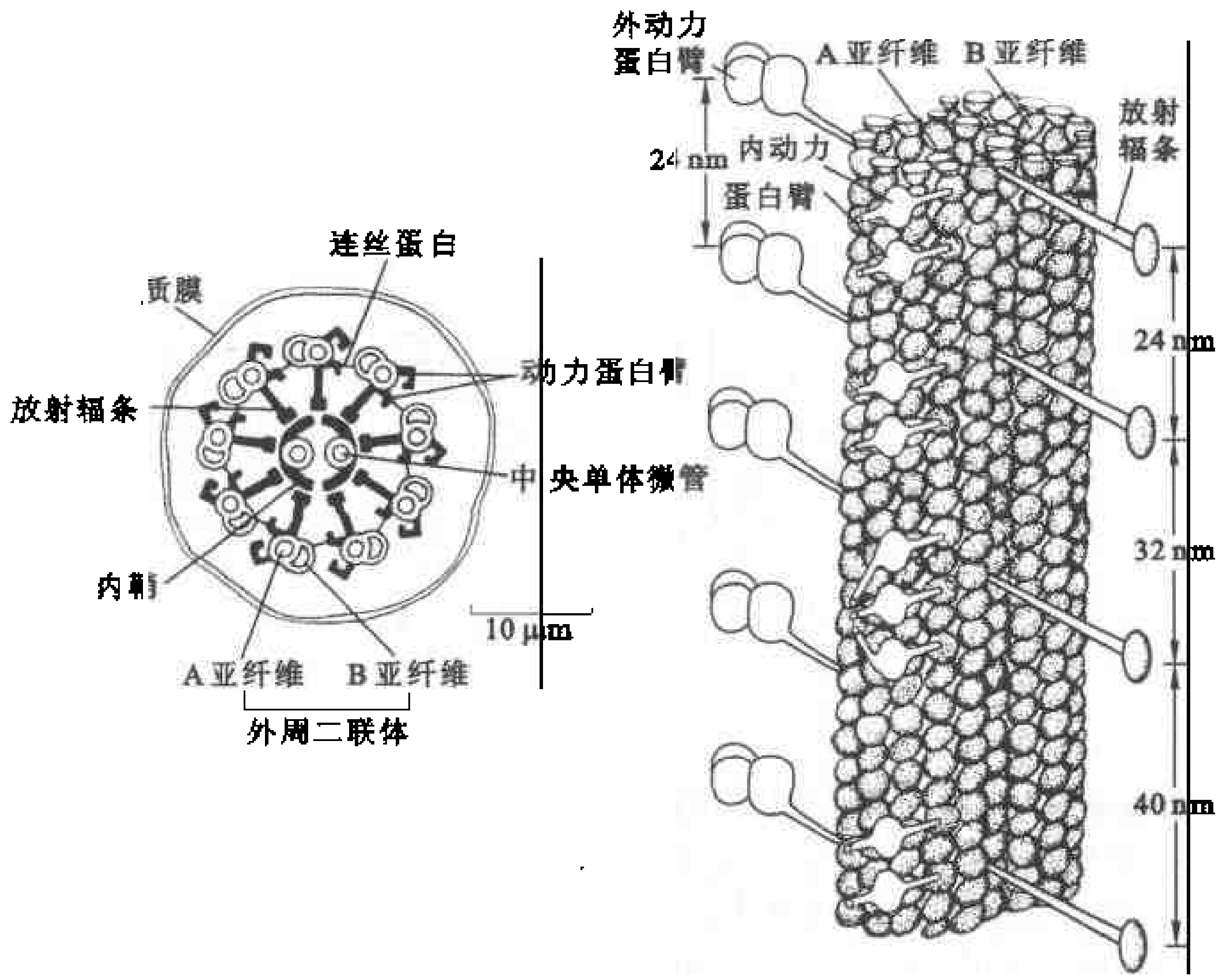


图 10-13 纤毛结构模式图

A:纤毛横切面;B:微管二联体及附属结构

轴心的主要蛋白结构(图10-13A):① 微管蛋白二聚体。二联体中的微管蛋白二聚体无秋水仙素结合部位。② 动力蛋白臂(dynein arms)。由微管二联体A亚纤维伸出,同相邻微管二联体B亚纤维相互作用使纤毛弯曲。动力蛋白相对分子质量为$300\times10^3\sim400\times10^3$,最初在鞭毛和纤毛中发现,是一种多亚单位高分子ATP酶,能为Ca^{2+}、Mg^{2+}所激活。近年来在胞质中亦发现动力蛋白,与微管多种功能活动有关,如细胞内运输,染色体趋极运动。③ 微管连接蛋白(nexin)。相对分子质量为$150\times10^3\sim160\times10^3$,将相邻微管二联体结合在一起。④ 放射辐条(radial spoke),有9条,由外围微管二联体A亚纤维伸向中央微管。⑤ 内鞘。

纤毛运动机制:滑动学说认为纤毛运动由相邻二联体间相互滑动所致(图

10－14)。① 动力蛋白头部与 B 亚纤维的接触促使动力蛋白结合的 ATP 水解产物释放,同时造成头部角度的改变;② 新的 ATP 结合使动力蛋白头部与 B 亚纤维脱开;③ ATP 水解,其释放的能量使头部的角度复原;④ 带有水解产物的动力蛋白头部与 B 亚纤维上另一位点结合,开始又一次循环。

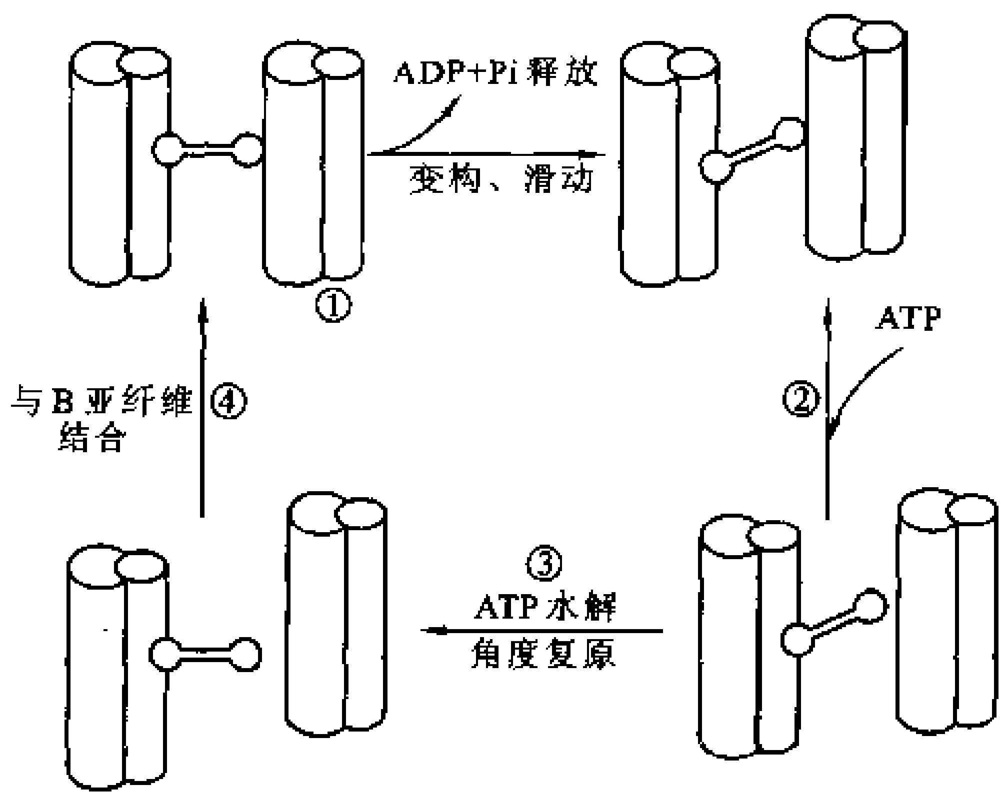


图 10－14　纤毛运动中的微管滑动机制

4. 纺锤体和染色体运动

当细胞从间期进入分裂期时,间期细胞胞质微管网架崩解,微管解聚为微管蛋白,经重装配形成纺锤体,介导染色体的运动;分裂末期,纺锤体微管解聚为微管蛋白,经重装配形成胞质微管网。

纺锤体微管可分类如下:① 动粒微管:连接动粒与两极的微管;② 极微管:从两极发出,在纺锤体中部互相交错重叠的微管;③ 星体微管:组成星体的微管。

有关染色体运动的分子机制曾有两种学说:① 动力平衡学说:认为染色体的运动与微管的装配－去装配有关;② 滑行学说:认为染色体的运动与微管间的相互滑动有关。目前对有丝分裂过程中染色体运动的机制有了比较深入的了解(详见第十一章第一节)。

5. 基体和中心粒

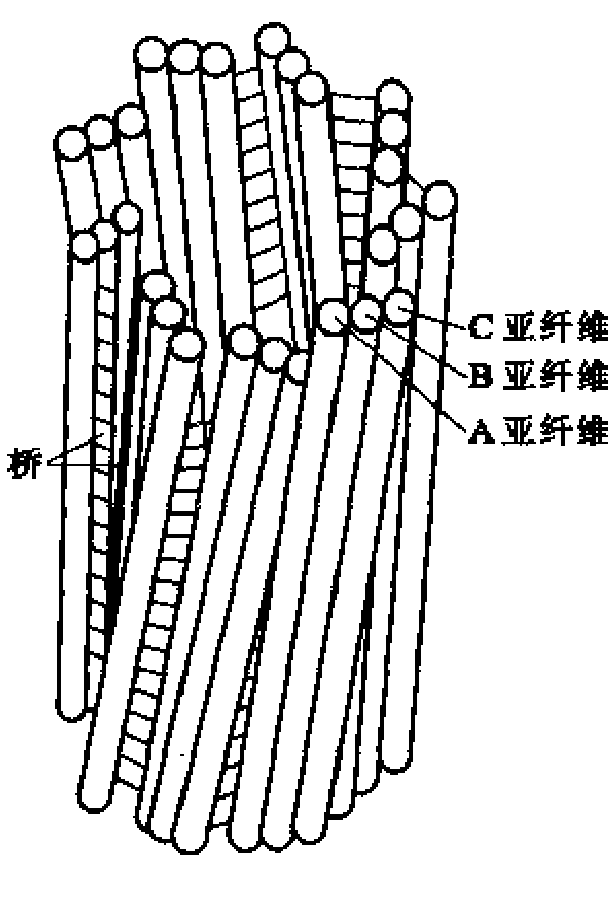


图 10－15　中心粒结构模式图

中心体(centrosome)是动物细胞中主要的微管组织中心,纺锤体微管和胞质微管由中心体基质囊多个 γ 管蛋白形成的

环状核心放射出来，中心体由一对相互垂直的中心粒(centrioles)及周围基质构成。位于鞭毛和纤毛根部的类似结构称为基粒(basal body)。

基粒和中心粒均是微管性结构，呈圆柱状，平均大小为 0.2～0.5 μm。其壁由 9 组微管三联体组成，亚纤维 A 为完全微管，亚纤维 B 和 C 为不完全微管(图 10－15)。亚纤维 A 和 B 跨过纤毛板与纤毛轴线中相应的亚纤维相延续，亚纤维 C 终止于纤毛板或基板附近。中心粒和基粒是同源的，在某些时候可以相互转变。

中心粒和基粒均具有自我复制性质。基粒中含有一个长度为 6 000～9 000 kb 的 DNA 分子，编码基粒功能所必需的几种蛋白。中心粒中是否含 DNA 尚有待证实，一般情况下，新的中心粒由原来的中心粒于 S 期复制，在某些细胞中，中心粒能自我发生。

三、中间纤维

20 世纪 60 年代中期，在哺乳动物细胞中发现 10 nm 纤维，因其直径介于粗肌丝和细肌丝之间，故被命名为中间纤维(又称中间丝，intermediate filament，IF)(图 10－16)。

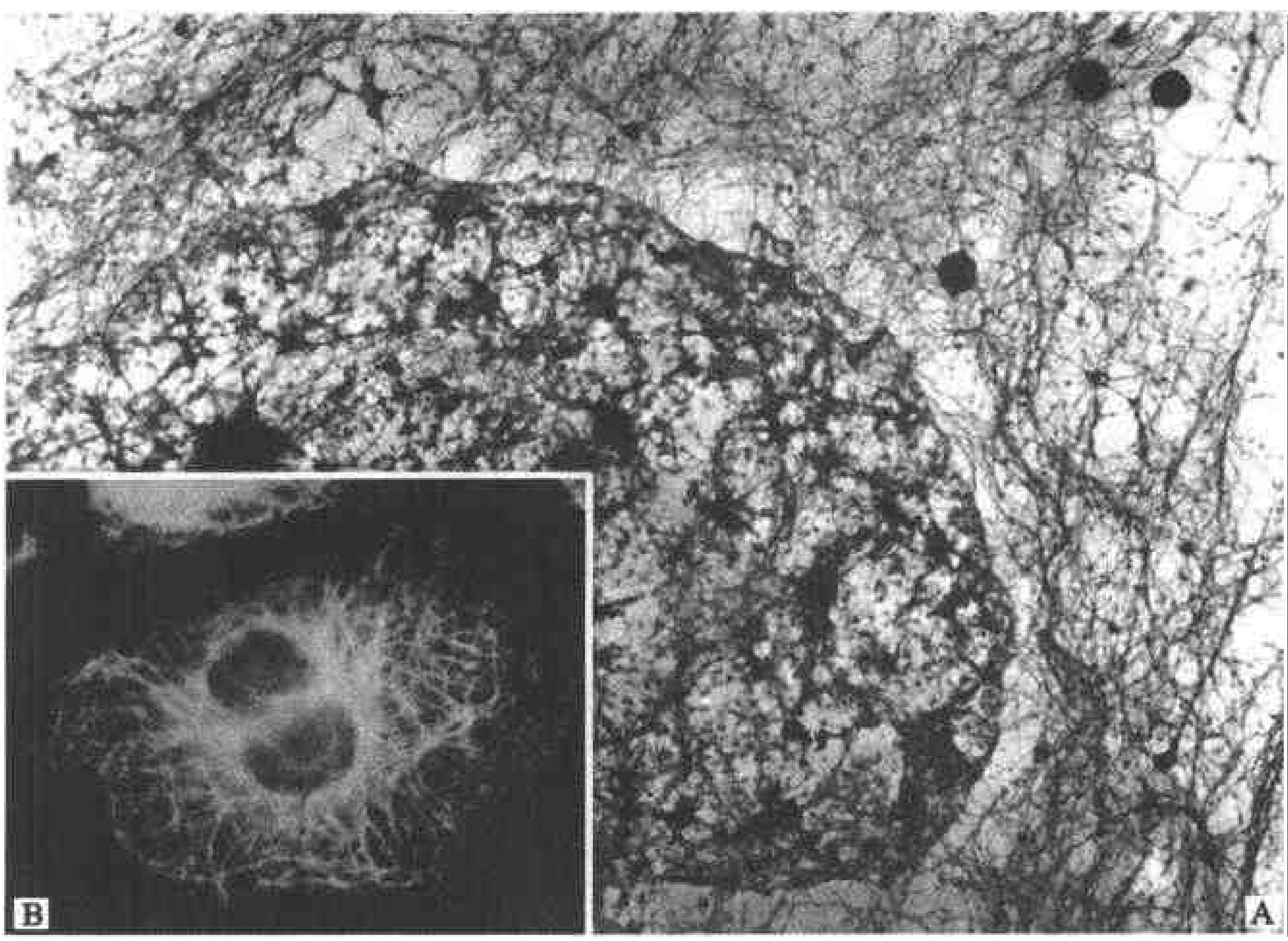


图 10－16 Hela 细胞中间纤维(翟中和与蔡树涛)
A：电镜照片；B：荧光显微镜照片

(一) 成分

中间纤维的成分比微丝和微管复杂，按其组织来源及免疫原性可分为 5 类

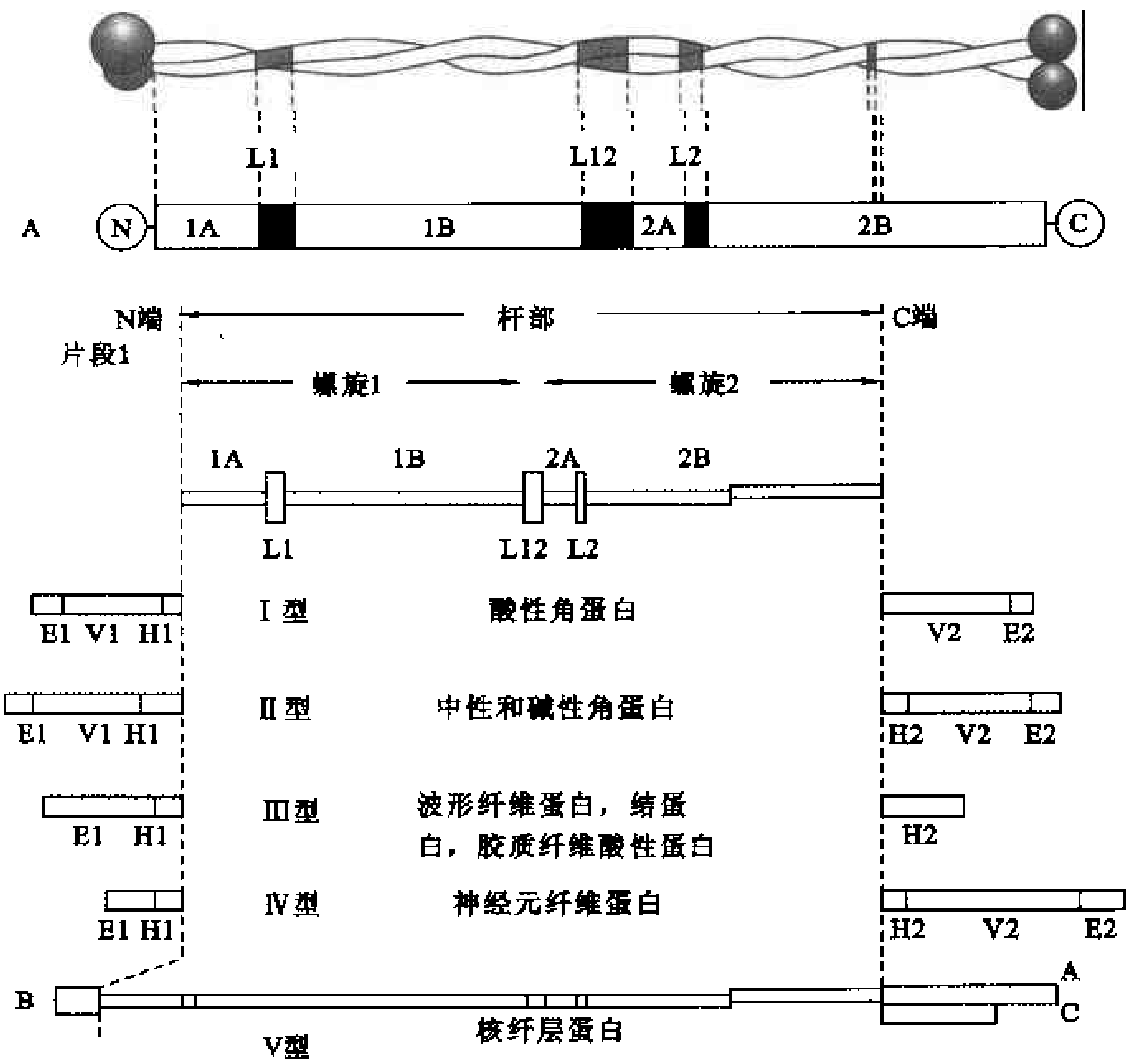
(表 10－3)：① 角蛋白纤维（keratin filament)，存在于上皮细胞中；② 波形纤维(vimentin filament)，存在于间质细胞和中胚层来源的细胞中；③ 结蛋白纤维(desmin filament)，存在于肌细胞中；④ 神经元纤维(neurofilament)，存在于神经元中；⑤ 神经胶质纤维(neuroglial filament)，存在于神经胶质细胞。中间纤维的分布具有严格的组织特异性。这一点已被应用于肿瘤临床鉴别诊断，以鉴别肿瘤细胞的组织来源。

中间纤维蛋白来源于同一基因家族，具有高度同源性。中间纤维蛋白结构特征如图 10－17 所示，在中间纤维蛋白分子肽链中部有一段约 310 个氨基酸残基的 α 螺旋区是高度保守的，两个相邻亚基的对应 α 螺旋区形成双股超螺旋，即 40～50 nm 的杆部(rod)，装配为中间纤维的主干(backbone)，这是 5 类中间纤维的共同结构特征。同一型的中间纤维蛋白其杆状区氨基酸顺序有 70%～90%的同源性，但不同型的中间纤维蛋白的同源性则低于 30%。中间纤维蛋白杆状区由螺旋 1 和螺旋 2 构成，螺旋 1 和螺旋 2 的长度约为 22 nm，杆状区长度约在 47 nm 左右。螺旋 1 和螺旋 2 又可分为 A，B 两个亚区，4 个螺旋区间由 3 个短片段相连接，其中 L12 连接螺旋 1 和螺旋 2，L1 和 L2 分别连接 1A 与 1B 和 2A 与 2B(图 10－17A)。

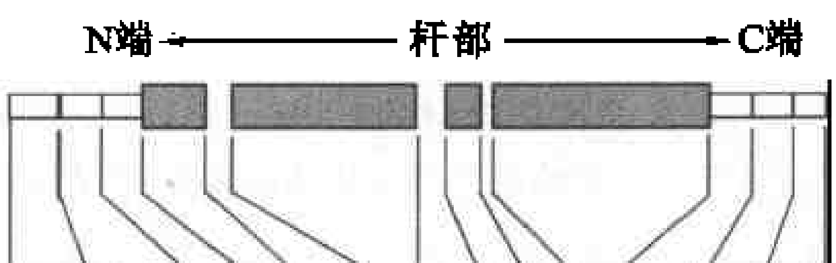
而中间纤维蛋白分子非螺旋化的头部(N 端)和尾部(C 端)的氨基酸顺序和肽链长度在各类不同中间纤维蛋白分子中有很大差异。对于每一特定类型的中间纤维蛋白，其头部和尾部又可进一步分为不同的亚区，① H 亚区：同源区；② V 亚区：可变区；③ E 亚区：末端区。根据中间纤维蛋白的氨基酸顺序的同源性，近年对中间纤维成分又提出新的分类(图 10－17B)：Ⅰ．酸性角蛋白；Ⅱ．中性和碱性角蛋白；Ⅲ．波形纤维蛋白，结蛋白，胶质纤维酸性蛋白，相对分子质量为 57×10^3 的神经中间纤维蛋白；Ⅳ．神经元纤维蛋白；Ⅴ．核纤层蛋白(核内中间纤维蛋白，见后文)。最近又发现一种新的中间纤维蛋白叫巢蛋白(nestin)。

表 10－3　中间纤维分类

纤维类型	蛋白亚基	相对分子质量/10^3	组织来源
角蛋白纤维	角蛋白(keratin) 19～22 种多肽	40～68	上皮细胞
波形纤维	波形纤维蛋白 一种多肽	55	间质细胞和中胚层来源的细胞
结蛋白纤维	结蛋白 一种多肽	53	肌细胞
神经元纤维	神经元纤维蛋白 三种多肽	68 160 200	神经元
神经胶质纤维	胶质纤维酸性蛋白 一种多肽	51	神经胶质细胞



C



	E1	V1	H1	1A	L1	1B	L12	2A	L2	2B	H2	V2	E2
Ia	?	?	≥7	35	11	101	16	19	8	121	≥0	?	?
Ib	0~10	65~140	7	35	11~14	101	16	19	8	121	0	0~110	5~30
IIa	?	?	≥32	35	10	101	17	19	8	121	≥10	?	?
IIb	5~70	20~160	36	35	11~14	101	17	19	8	121	20	25~125	21
III	19~81		20	35	8	101	16	19	8	121	58	0	0
IV-L	0	0	91	35	10	101	17	19	8	121	81	60~70	
IV-M	0	0	102	35	10	101	17	19	8	121	≥88	?	?
IV-H	0	0	97	35	10	101	22	19	8	121	>110	?	?
V	0	0	30	41	0	148	19	19	8	121	179	?	?

图 10－17 中间纤维蛋白分子结构

A：中间纤维蛋白分子杆状区模式图(引自 Parny & Fraser，1985)；B：各型中间纤维蛋白分子一级结构模式图(引自 Steinert & Roop，1988)；C：各型中间纤维蛋白功能区氨基酸残基数(引自 Conway & Parry，1989)

（二）中间纤维蛋白基因

中间纤维蛋白基因的结构已基本清楚（图 10－18），同型中间纤维蛋白基因具有几乎一致的内含子/外显子结构，Ⅰ～Ⅲ型中间纤维蛋白基因在其顺序组织上相似，Ⅳ型中间纤维蛋白基因在其顺序组织上与Ⅰ～Ⅲ型中间纤维基因有较大差别。

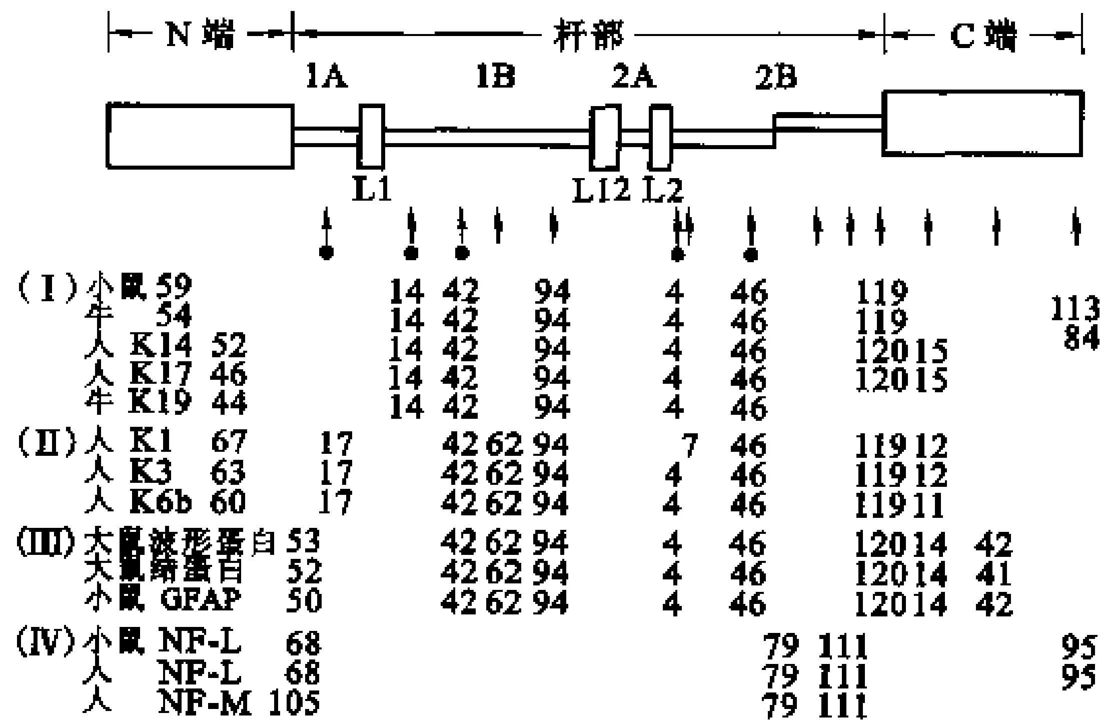


图 10－18　中间纤维蛋白基因结构

箭头示内含子所在位置，数字示中间纤维蛋白杆状区或 C 端区域氨基酸序号（引自 Goldme，1991）

中间纤维蛋白基因表达：①人体中有 50 多种不同的中间纤维蛋白基因。中间纤维蛋白的表达具有严格的组织特异性；②几乎所有的人体细胞中均有中间纤维蛋白表达，约占细胞总蛋白的 1%，但某些细胞中，如角质细胞和神经元，中间纤维蛋白非常丰富，约占细胞总蛋白的 85%。中间纤维基因蛋白表达的组织和发育调节可能是在转录和转录后水平，但其规律尚不清楚。

（三）装配

中间纤维蛋白装配为中间纤维的过程如图 10－19 所示，中间纤维蛋白的杆部装配为中间纤维的主干。

首先，两个相邻亚基的对应 α 螺旋区形成双股超螺旋，即二聚体。研究表明，二聚体中中间纤维蛋白平行排列，50 nm 长。Ⅰ、Ⅱ型中间纤维蛋白分子（角蛋白）装配为异二聚体（heterodimer），尽管在体外装配中同二聚体是可能的。一般由一种Ⅰ型角蛋白和一种与之相配对的Ⅱ型角蛋白装配成二聚体。Ⅲ～Ⅳ型中间纤维蛋白分子由相同的分子装配为二聚体，即同二聚体（isodimer）。

中间纤维装配的第二步是二聚体怎样装配为四聚体（tetramer）。目前认为由两对超螺旋形成四聚体，四聚体可能是中间纤维解聚的最小亚单位。对四聚体中分子如何排列尚有争议，可能是平头（50 nm）或半交叠（70 nm），很可能是反向平行排列（例如，中间纤维没有极性），但也不排除顺向平行排列的可能。关于反向平行和半分子交叠发生在四聚体内还是四聚体间，尚有待进一步研究。

由四聚体或八聚体进一步装配为中间纤维的确切方式尚不清楚，装配好的中间纤维具有多态性，最多见的是由 8 个四聚体或 4 个八聚体装配为中间纤维，中间纤维横截面可由 32 个分子组成；也有一些中间纤维，在横截面上包含 5～6 个或 11～12 个四聚体。此外，中间纤维可能有原纤维(四聚体)或原丝(八聚体，protofibril)等中间类型。

中间纤维蛋白杆部形成中间纤维的核心，直径为 8～9 nm。中间纤维蛋白的末端大多凸出于中间纤维的核心之外，中间纤维 22 nm 或 48 nm 的纵向周期与末端区突出有关。中间纤维真正的直径取决于肽链末端的大小，通常为 12～16 nm，由于外侧 2～3 nm 的密度较低，电镜下难以分辨，故中间纤维在电镜下一般为 10 nm 左右。由中间纤维核心伸出的末端区可能和中间纤维与细胞内结构相互作用及功能有关。

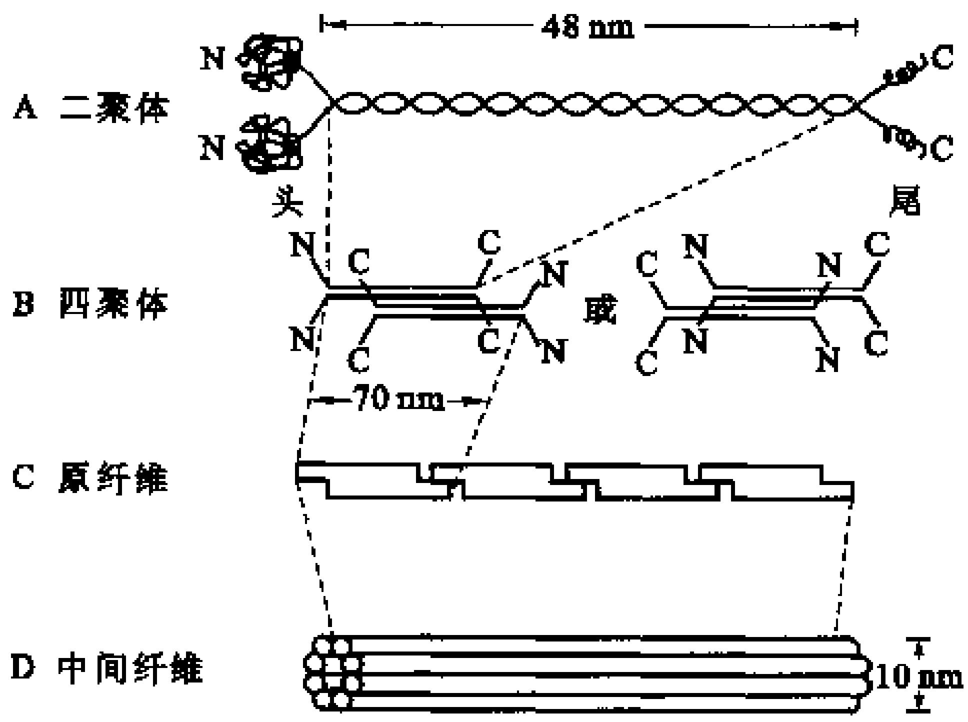


图 10－19 中间纤维装配模型(引自 Klymkowsky)
A:两条中间纤维多肽链形成超螺旋二聚体；B:两个二聚体反向平行以半交叠方式构成四聚体；C:四聚体首尾相连形成原纤维；D:8 根原纤维构成圆柱状的 10 nm 纤维

(四) 中间纤维结合蛋白

中间纤维结合蛋白(intermediate filament associated protein IFAP)是一类在结构和功能上与中间纤维有密切联系，但其本身不是中间纤维结构组分的蛋白。IFAP 可能在中间纤维上或其两端与中间纤维紧密或松散结合。可能作为细胞中中间纤维超分子结构的调节者。

确定 IFAP 的标准：① 在细胞内与中间纤维共分布；② 抗高盐与非离子去垢剂抽提，与中间纤维共同分离；③ 与中间纤维经历相同的解聚和重装配周期；④ 在体外能与中间纤维结合。

迄今为止已报道了大约 15 种 IFAP，如① filaggrin，其功能是使角蛋白纤维聚集，在角质化细胞中形成大的纤维聚集物，该蛋白的表达是角质化的分化特异

性标志；② plectin 蛋白，相对分子质量：> 500×10^3，大多数细胞中有该蛋白的表达，在中间纤维、微管及微丝间形成横桥；③ IFAP300，将中间纤维锚定在桥粒上；④ BPAG1 定位于内侧桥板，BPAG1 缺失小鼠表皮细胞中内侧桥板消失，角蛋白纤维与桥粒的连接破坏。其他一些蛋白也具有 IFAP 的性质：如桥板蛋白(desmoplakin)1 和 2 参与桥粒形成；微管结合蛋白(MAP_2)参与中间纤维与微管间横桥；血影蛋白(spectrin)参与中间纤维与膜结合；锚蛋白(ankyrin)参与中间纤维与膜结合。

已了解 IFAP 的一些特性可归结如下：① 已经分离的 IFAP 具有中间纤维类型特异性；② IFAP 的表达有细胞专一性；③ 不同的 IFAP 可存在于同一个细胞中，与不同的中间纤维组织状态相联系；④ 在细胞中某些 IFAP 的表达与细胞的功能和发育状态有关。

（五）中间纤维的组织及动态变化

与微丝、微管不同，中间纤维蛋白合成后，基本上均装配为中间纤维，游离的单体很少。采用中间纤维蛋白荧光漂白技术显示单根的中间纤维半寿期小于 1 h。说明中间纤维的装配与去装配是动态的。细胞内的中间纤维蛋白均受到不同程度的化学修饰，包括乙酰化，磷酸化等，可能与中间纤维的动态变化及功能活动有关。

对细胞中中间纤维的组织尚了解不多，在同一个细胞中，中间纤维有不同的组织结构，如散在的纤维、复杂的网络结构、粗大的中间纤维束、密集的中间纤维“邻核帽”(juxta - nuclear cap)等，中间纤维在胞质中形成精细发达的纤维网络，外与细胞膜及细胞外基质相连，内与核纤层有直接联系。在胞质中中间纤维与微丝、微管及其他细胞器有错综复杂的纤维联络。

在一定的生理条件或实验条件下，中间纤维或中间纤维网会发生改变，如有丝分裂过程中中间纤维发生解聚和重装配。其他如胰酶消化、秋水仙素处理、显微注射中间纤维蛋白抗体、热休克、病毒感染、酒精肝、Alzhemer’s 病都可对细胞内中间纤维网的组织状态产生影响，使中间纤维网崩塌。

迄今对组织中的中间纤维的结构组织仅有一些概念性的了解，中间纤维通过桥粒在细胞间连续，推测中间纤维跨细胞的结构，对维持上皮的连续性是重要的。

（六）中间纤维与细胞分化

微丝和微管在各种细胞中都是相同的，而中间纤维蛋白的表达具有组织特异性，中间纤维与细胞分化的关系非常密切，引起广泛重视。研究主要集中在胚胎发育和上皮分化两个方面：

(1) 胚胎发育

小鼠胚胎发育过程中，最初胚胎细胞中表达角蛋白，胚胎发育到第 8～9 天，将要发育为间叶组织的细胞中，角蛋白表达下降并停止，同时出现波形纤维蛋白的表达。类似的表型变化见于神经外胚层发育中，首先是出现角蛋白的表达，第 11 天左右，角蛋白表达停止，波形纤维蛋白出现；一些将要发育为星形细胞的细胞在第 18 天左右开始同时表达波形纤维蛋白和胶质酸性蛋白，而另一些将要

发育为神经细胞的细胞在表达角蛋白向波形纤维蛋白表达转变后短时间内即开始表达神经元纤维蛋白，继而波形纤维蛋白表达下降并停止。由此可见，胚胎细胞能根据其发育的方向调节中间纤维蛋白基因的表达。

(2) 上皮分化

在上皮组织的分化过程中，角蛋白表达的变化为研究中间纤维与细胞分化的关系提供了一个重要例证(图 10－20)，在上皮细胞中，酸性角蛋白(Ⅰ型)和中性－碱性角蛋白(Ⅱ型)成对表达，并具有特异性。如单层上皮细胞中特异表

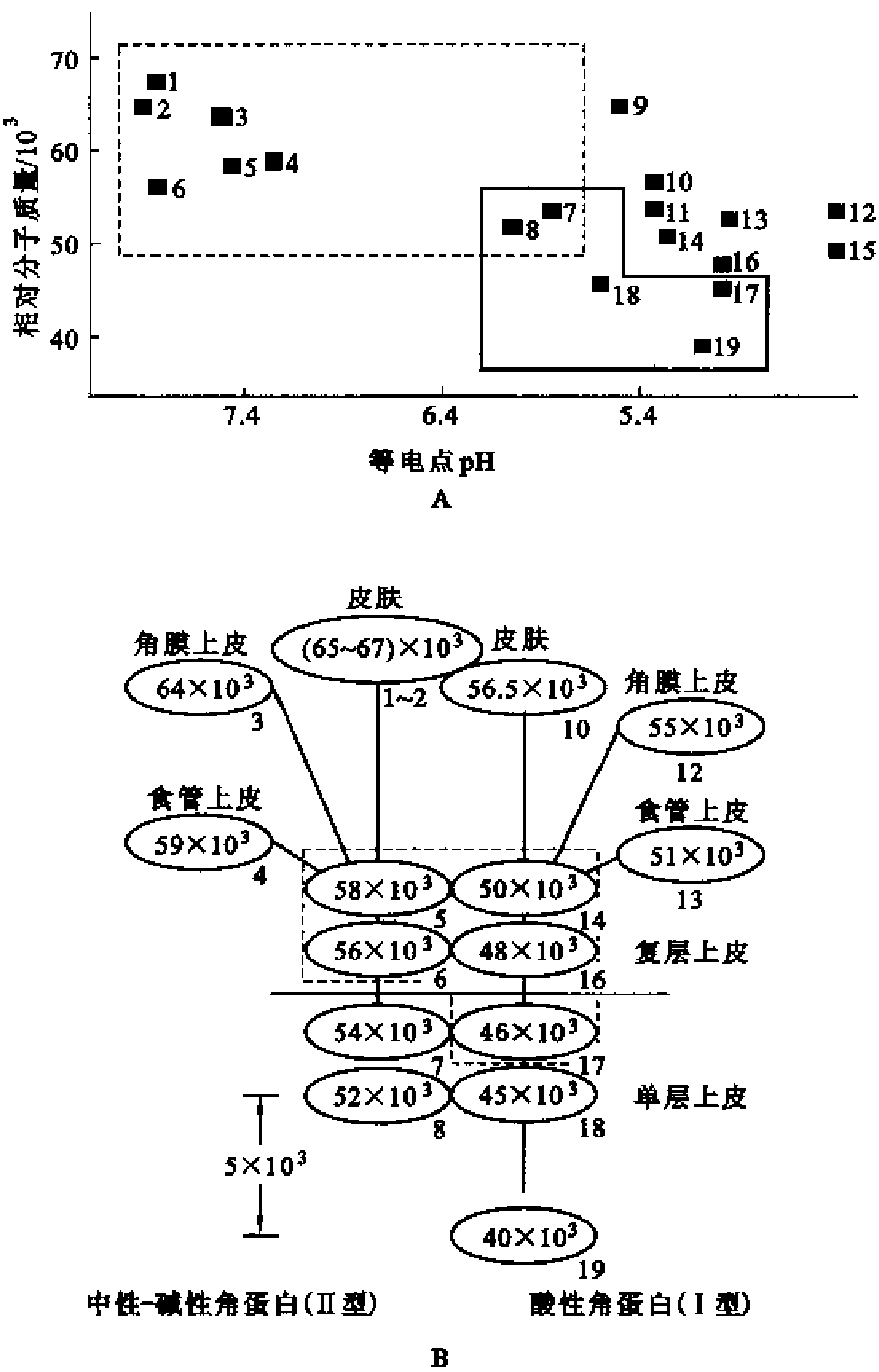


图 10－20　A：人组织中的角蛋白(引自 Moll 等，1982)；
B：上皮组织分化过程中角蛋白表达的变化(引自 Sun 等，1984)

达 K_{18}($Mr\ 45\times10^3$) - K_8($Mr\ 52\times10^3$)和 K_{17}($Mr\ 46\times10^3$) - K_7($Mr\ 54\times10^3$)两对角蛋白;复层上皮细胞中特异表达 K_{16}($Mr\ 48\times10^3$) - K_6($Mr\ 56\times10^3$)和 K_{14}($Mr\ 50\times10^3$) - K_5($Mr\ 58\times10^3$)两对角蛋白;食管上皮细胞中特异表达 K_{13}($Mr\ 51\times10^3$) - K_4($Mr\ 59\times10^3$)角蛋白对;角膜上皮细胞中特异表达 K_{12}($Mr\ 55\times10^3$) - K_3($Mr\ 64\times10^3$)角蛋白对;皮肤细胞中特异表达 K_{10}($Mr\ 56.5\times10^3$) - (K_1　K_2)($Mr\ (65\sim67)\times10^3$)角蛋白对。角蛋白对中,酸性角蛋白(Ⅰ型)和中性-碱性角蛋白(Ⅱ型)相对分子质量通常相差 8×10^3。

迄今关于中间纤维在细胞分化中的变化已积累了很多资料,但有关中间纤维在细胞分化中的作用尚不清楚。

(七)中间纤维在生物进化中的起源

自发现中间纤维以来,一般认为中间纤维在生物进化中的起源比微丝和微管晚,免疫细胞化学、电镜及生化研究显示中间纤维似乎局限于脊椎动物细胞,其进化上的保守性比微丝和微管要差。然而,近年来有一些报道显示在无脊椎动物细胞中也存在类中间纤维蛋白或 10nm 样纤维。植物细胞中可能存在类中间纤维的证据。

从中间纤维蛋白一级结构及其基因的分析认为中间纤维蛋白应属于同一基因家族,由同一个祖先基因进化而来,并提出中间纤维蛋白基因进化模式。Ⅰ～Ⅲ型中间纤维蛋白与Ⅳ型中间纤维蛋白较早分叉,从蛋白一级结构及其基因结构看,核纤层蛋白可能代表中间纤维蛋白较原始的形式。对无脊椎动物线虫细胞中间纤维蛋白一级结构的研究表明,核纤层蛋白与无脊椎动物细胞中间纤维蛋白更为相似。

(八)功能

中间纤维的功能至今仍不清楚,一个重要的原因是迄今尚未找到一种中间纤维特异性工具药。近年来,采用转基因(transgene)和基因缺失(gene deletion)小鼠研究中间纤维蛋白及中间纤维结合蛋白的功能,取得重大突破。

一般认为,中间纤维在细胞质中起支架作用,并与细胞核定位有关。同时,中间纤维在细胞间或者组织中起支架作用,①角蛋白纤维参与桥粒的形成和维持。角蛋白基因缺失研究表明,角蛋白纤维网络对于维持上皮组织细胞间联接及上皮组织结构完整是极为重要的。目前已经证实,某些疾病与上皮细胞中特定的角蛋白基因突变有关;②结蛋白纤维是肌肉 Z 盘的重要结构组分,对于维持肌肉细胞的收缩装置起重要作用。在结蛋白缺失的实验小鼠中,肌纤维排列异常,收缩力减弱,说明结蛋白在肌肉分化和形态发生中起重要作用。

近年来发现中间纤维与 mRNA 的运输有关,胞质 mRNA 锚定于中间纤维可能对其在细胞内的定位及是否翻译起决定作用。

表 10－4　细胞质骨架主要成分的比较

	微　管	微　丝	中间纤维
成分	微管蛋白	肌动蛋白	6 类中间纤维蛋白
相对分子质量	50×10^3	43×10^3	$40\times10^3 \sim 200\times10^3$
纤维直径	22 nm	7 nm	10 nm
纤维结构	13 根原纤维组成的空心管状纤维	双股螺旋	多级螺旋
极性	有	有	无
单体蛋白库	有	有	无
踏车现象	有	有	无
特异性药物	秋水仙素 长春花碱 紫杉酚	细胞松弛素 B 鬼笔环肽	无
结合蛋白	有	有	有

第二节　细胞核骨架

一、核基质

细胞核骨架是存在于真核细胞核内的以蛋白成分为主的纤维网架体系。目前对核骨架的概念有两种理解，狭义的核骨架仅指核内基质（inner nuclear matrix，inner nucleoskeleton），即细胞核内除核膜、核纤层、染色质、核仁和核孔复合体以外的以纤维蛋白成分为主的纤维网架体系；广义的核骨架包括核基质、核纤层和核孔复合体。

长期以来，对细胞核的研究主要集中于染色质、核仁和核膜，尤其是注重对DNA、RNA、组蛋白和核酸酶的研究。核骨架曾长期被人们所忽视，直到 20 世纪 70 年代中期，Berezney 和 Coffey 等（1974）才首次将核骨架作为细胞核内独立的结构体系进行研究，用非离子去垢剂、核酸酶与高盐缓冲液对大鼠肝细胞进行处理，当核膜、染色质与核仁被抽提后，发现核内仍存留有一个以纤维蛋白成分为主的网架结构。此后，真核细胞中核骨架的客观存在相继为其他实验室所证实，并发现核骨架与 DNA 复制、RNA 转录和加工、染色体装配及病毒复制等一些重要的生命活动有关。

（一）形态结构

近年来，核骨架的研究取得很大进展，成为细胞生物学研究的一个新的生长点。细胞核内物质密度较大，且有大量染色质纤维，直接在原位研究核骨架的形态结构及成分相当困难。在核骨架研究中，一般首先分离核骨架，然后研究其结构成分及功能。最早是 Coffey 等用非离子去垢剂、核酸酶与高盐缓冲液（2mol/

L NaCl)处理细胞核，分离核骨架。值得一提的是 Penman 等建立的细胞分级抽提方法。先用非离子去垢剂处理细胞，溶解膜结构系统，胞质中可溶性成分随之流失，主要存留细胞骨架体系；再用 Tween－40 和脱氧胆酸钠处理，胞质中的微管、微丝与一些蛋白结构被溶去，胞质中只有中间纤维网能完好存留；然后用核酸酶与 0.25mol/L 硫酸铵处理，染色质中 DNA、RNA 和组蛋白被抽提，最终核内呈现一个精细发达的核骨架网络，结合非树脂包埋－去包埋剂电镜制样方法，可清晰地显示核骨架－核纤层－中间纤维结构体系。此后，又有更接近于生理条件的核骨架制备方法出现，如用 3,5－二碘水杨酸锂(LIS)处理细胞核来分离核骨架。

核骨架的形态结构根据不同报道有所差异，Berezney 与 Coffey (1974)等采用高盐溶液 2mol/L NaCl 处理，在核内显示一个以纤维蛋白成分为主的核基质；Penman 等采用比较温和的细胞分级抽提方法，在核内显示出精细发达的核骨架纤维网络，核骨架纤维直径为 3～30 nm，估计单丝直径约 3～4 nm，粗纤维可能是单纤维的复合体，也有报道认为核骨架核心纤维(core filament)的直径为 9 nm，核仁与染色质网络于核骨架纤维网络中，核内骨架与核纤层有丰富的纤维联络，构成统一的核骨架网络(图 10－21)。

(二) 成分

核骨架的成分比较复杂，主要成分是核骨架蛋白及核骨架结合蛋白，并含有少量 RNA。RNA 的含量虽然很少，但它对于维持核骨架三维网络结构的完整性是必要的。分离的核骨架中常含有少量 DNA，一般认为这是一种功能性结合。核骨架不像胞质骨架，诸如微丝、微管和中间纤维那样，由非常专一的蛋白成分组成，不同类型细胞，其细胞周期不同阶段以及正常与癌变细胞的核骨架成分都可能有所差别。用双向电泳技术可显示出 400 多种核骨架蛋白成分(图 10－22)，这些蛋白可以分为两类：一类是各种类型的细胞共有的；另一类则与细胞类型及分化程度相关。目前关于核骨架蛋白的确切组分尚未取得共识，这也是核骨架研究中争议较多之处。分离鉴定功能性的核骨架蛋白是目前核骨架研究一个重要领域，长期以来人们对此进行了大量的研究并证实一些与 DNA、RNA 代谢合成密切相关的酶类，细胞信号识别和细胞周期的调控因子以及病毒特异的调控蛋白等能够紧密结合在核骨架结构上。

1. 核骨架蛋白

这类蛋白与富含 AT 的 DNA 序列即核骨架结合序列(matrin association region, MAR)结合，又称为 MAR 结合蛋白，无严格的 DNA 序列特异性，可区分 MAR 和非 MAR DNA，通常与 DNA 放射环两端的 MAR DNA 序列结合，将其锚定在核骨架上，以形成 DNA 放射环。已鉴定的 MAR 结合蛋白有：

(1) DNA 拓扑异构酶Ⅱ(DNA topoisomeraseⅡ)：是间期细胞核骨架和分裂期染色体骨架的重要成分之一；

(2) 核基质蛋白(nuclear matrin)：有 matrin D, E, F, G4 等，定位于核基质，且呈现纤维颗粒样分布，很可能是核基质上 DNA－loop 的结合蛋白；

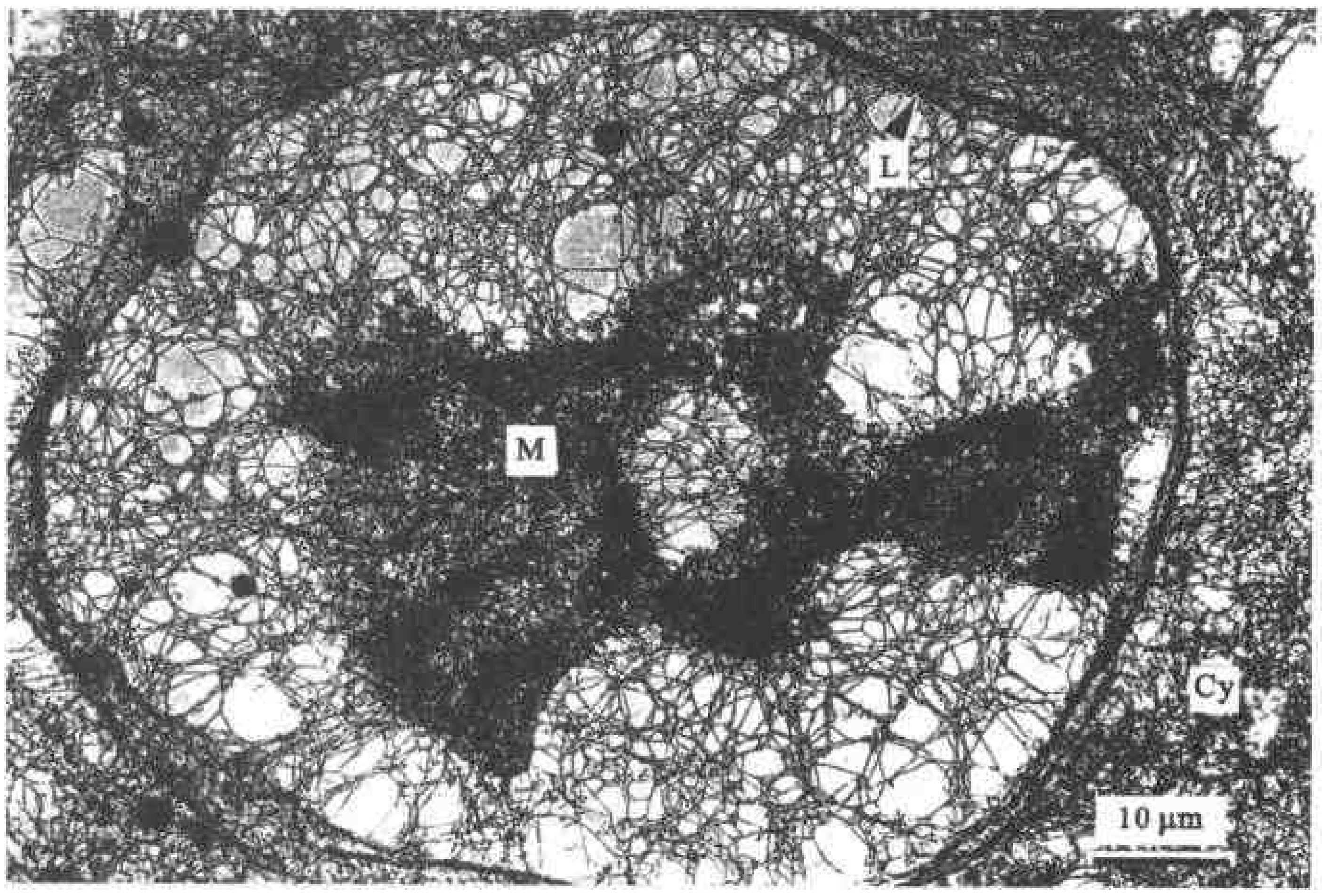


图 10-21 核骨架的核心纤维
L 核纤层；M 核仁；Cy 细胞质（引自何大澄等，1990）

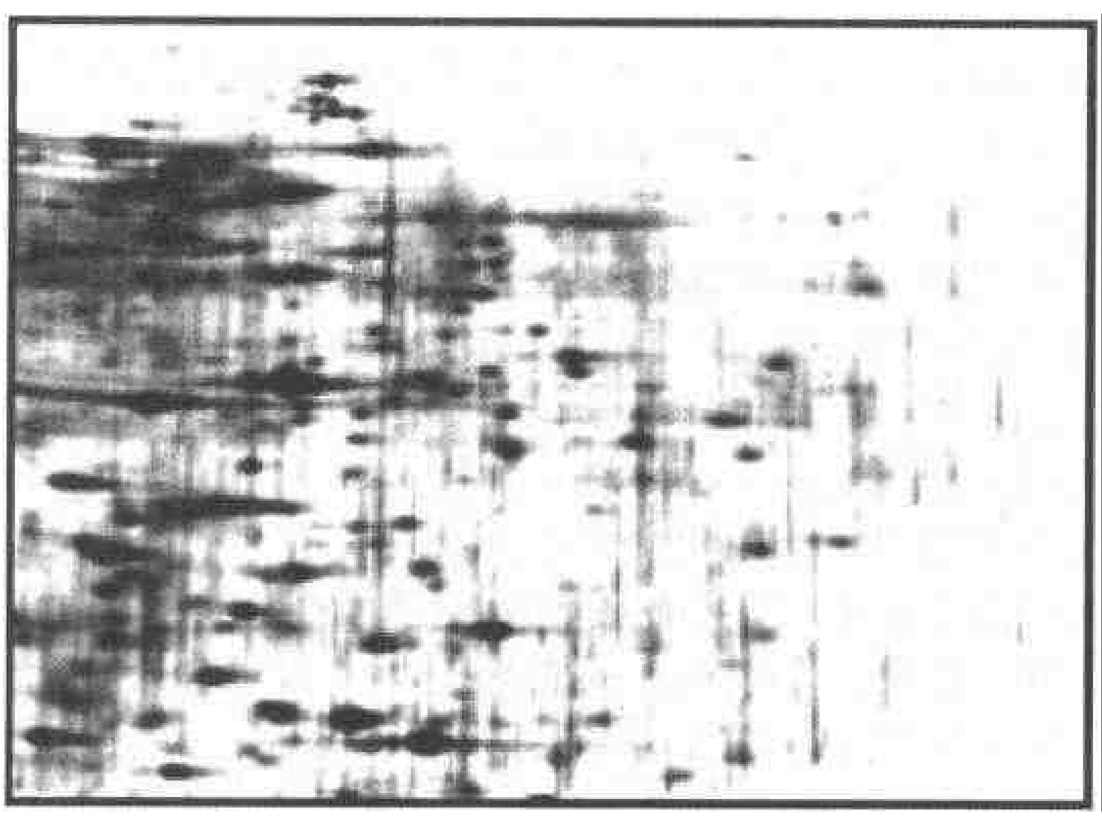


图 10-22 双向电泳技术显示 HL_{60} 细胞核骨架蛋白图谱（金梅林，邱殷庆）

（3）$Nuc2^+$ 蛋白：$Nuc2^+$ 蛋白是 *S. pombe*（一种酿酒用的酵母）的 *Nuc2*$^+$ 基因编码的蛋白，相对分子质量为 76×10^3。*Nuc2*$^+$ 基因在有丝分裂染色体分离过程中起重要作用，$Nuc2^+$ 蛋白存在于核基质以及染色体支架组分当中，而且与富含 AT 的 DNA 序列有特异的亲和性；

（4）ARBP（attachment region binding protein）能够特异地与 MAR 序列结合，而且在各种组织中广泛存在，不具有组织特异性；

(5) 着丝缢痕结合蛋白 (ARS consensus binding protein,ACBP)是酵母中发现的与自动复制序列结合的蛋白;

(6) 组蛋白 H1(histone 1):与基因静息(gene silencing)及维持染色质高级结构有关;

(7) HMG1,2(high mobility group 1,2),2:转录因子,识别富含 AT 的十字形结构(cruciform);

(8) 核纤层蛋白 A,B(lamin A,B):定位于核周,与 MAR DNA 结合,将染色质锚定于核纤层;

(9)支架附着因子 A (scaffold attachment factor A,SAF-A):体外实验中与裸露 DNA 形成放射环结构;

(10) SATB1(specific AT-rich DNA binding protein 1):AT 特异性 MAR 结合蛋白,与 γ 球蛋白 3′增强子结合;

(11) Sp120:相对分子质量为 120×10^3 的蛋白与 Igκ(kappa)MAR 结合;

(12) 核仁蛋白(nucleolin):与 RNA 或富含 T 的单链 DNA 结合,调控 rRNA 的转录和核糖体的装配。

2. 核骨架结合蛋白

(1) 转录因子,具有严格的 DNA 序列特异性:① 腺病毒 E1A 蛋白:腺病毒的转录与复制因子,与核骨架结合;② NF-1(核因子-1):与 H5 增强子结合,抗 0.25 mol/L 硫酸铵或 2mol/L NaCl 抽提,见于成熟红细胞,肝细胞核基质;③ SV-40T 抗原:复制起始因子和解旋酶(helicase),病毒复制起始时锚定于核骨架;④ 艾滋病毒 Tat 蛋白:将病毒基因组锚定于核骨架上。

(2) 酶:① 组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶:鸡未成熟红细胞中 60%~70%酶活性位于核骨架上,调节活性染色质与核骨架的结合状态;② DNA 聚合酶 α 及 β:定位于核骨架,与 DNA 合成及修复有关;③ 多 ADP-核糖聚合酶(poly(ADP-ribose)polymerase,PARP):不同细胞中 5%~26%酶活性与核骨架有关,DNA 链断裂激活 PARP;④ 酪蛋白激酶。

(3) 受体:研究发现,许多细胞核内激素受体是核骨架结合蛋白,如① 肾上腺皮质激素受体;② 雄激素受体;③ 雌激素受体;④ 甲状腺素受体。

(4) 供体:① 视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein,RP),与 E2F,C-Myc,Cyclin 相互作用,调节基因表达和 Gys 的转变,G_1 早期高度磷酸化的 RP 蛋白结合于核骨架,肿瘤细胞中突变的 RP 蛋白不与核骨架结合;② 前列腺素受体结合蛋白 1 和 2(RBF-1,RBF-2),肝细胞核骨架中含量丰富,参与癌基因 *c-myc* 和 *c-jun* 的调节。

3. 其他

(1) B23:核仁中 40K 蛋白,与核糖体装配和 rRNA 加工有关;

(2) 肌动蛋白:有报道在核骨架蛋白中发现肌动蛋白。

(三) 核骨架结合序列

分离的核骨架中存留有少量 DNA,约占总 DNA 的 3%。这部分 DNA 与核

骨架蛋白的结合不为高盐溶液抽提所破坏。近年来，发现在 DNA 序列中存在核骨架结合序列(MAR)。MAR 一般位于 DNA 放射环或活性转录基因的两端。在溶菌酶基因两端接上 MAR，可增加基因表达水平 10 倍以上。说明 MAR 在基因表达调控中有作用。

核骨架结合序列的基本特征有：① 富含 AT；② 富含 DNA 解旋元件(DNA unwinding elements)；③ 富含反向重复序列(inverted repeats)；④ 含有转录因子结合位点。

上述特征显示 MAR 有可能成为一种新的基因调控元件。目前已在上百种基因中鉴定了 MAR，在已鉴定的 MAR 中，有的与增强子有关，有的与启动子有关，有的与复制起始点有关。MAR 或与上述基因调控元件共序列，或与之相邻。

估计每个细胞核中有 100 000 个 MAR。MAR 的功能有：① 通过与核骨架蛋白的结合，将 DNA 放射环锚定在核骨架上；② 作为许多功能性基因调控蛋白的结合位点。这些蛋白通过与 MAR 的结合，在 DNA 分子上形成蛋白复合体，参与 DNA 的复制、转录、修复和重组的调控。

(四) 功能

早在 20 世纪 70 年代，人们即已能在分子水平上对 DNA 进行操作，但对如此长的 DNA 分子在细胞核这样小的空间内如何折叠装配知之甚少。核骨架的研究使人们对细胞核的结构装配有了新的认识。一般认为，核骨架为细胞核内组分布局提供了一个结构支架，细胞核内许多重要的生命活动与核骨架有关。

1. 核骨架与 DNA 复制

Jacob 等(1963)就曾设想真核细胞中 DNA 复制可能需要一个结构支架(structure framework)，原核细胞的 DNA 复制是结合在细胞膜上进行的。真核细胞中是否存在类似的支撑结构？DNA 的复制是否结合在核膜上进行？研究表明真核细胞中 DNA 复制与核膜没有直接的关系，更无专一的结合位点。20 世纪 70 年代中期，染色质结构的研究取得了突破性进展，核小体作为染色体基本结构单位的发现具有十分重要的意义，但并没有回答真核细胞中 DNA 复制和基因表达的空间支架是什么这样一个很重要的问题。

最初的 DNA 复制模式认为，可溶性的 DNA 聚合酶结合于 DNA 复制起始点(origin)后沿模板移动合成新 DNA。实际上，高度纯化的 DNA 在进行体外复制时，效率低，复制错误多。而在粗提物中，如非洲爪蟾卵提取物无细胞系统(*Xenopus Laevis* egg extracts cell free system)中(含骨架组分)，DNA 复制效率很高。此外，如果 DNA 聚合酶模板移动合成新 DNA，则可以设想 DNA 复制位点(replication site)是随机分布于细胞核内的。实验表明 DNA 合成部位在细胞核内不是随机分布的，而是相对集中于某些部位，如精子核中有 100～300 个复制灶(replication foci)，每个复制灶中至少有 300～1 000 个复制叉(replication fork)，很难想象非锚定的 DNA 聚合酶能在时间和空间上如此集中协调一致，说明 DNA 的复制的确需要一个结构支架。

以小鼠再生肝细胞为材料，显示新合成的 DNA 结合在核内蛋白基质网

上。$^{3}H-TdR$ 标记 30 min 的 3T3 细胞中，与核骨架结合的 DNA 中 90% 是新合成的 DNA，并证明这种结合并非提取过程中产生的非专一性结合；电镜放射自显影进一步表明 DNA 复制位点结合在核骨架上。研究发现 DNA 放射环普遍存在于间期细胞核和分裂期染色体中，放射环的根部结合在骨架纤维上，DNA 以放射环的形式与 DNA 复制的酶及因子锚定于核骨架上形成 DNA 复制复合体(DNA replication complex)进行 DNA 复制合成。有令人信服的证据表明，真核细胞中的 DNA 聚合酶结合于核骨架上，DNA 聚合酶在核骨架上可能具有特定的结合位点，DNA 聚合酶通过结合于核骨架上而被激活；近年来，证实 DNA 复制起始点是核骨架结合序列(MAR)。上述研究说明，核骨架是 DNA 复制的空间支架。

2. 核骨架与基因表达

核骨架与基因表达的关系大致可分为两类：一是核骨架与基因转录活性的关系；二是核骨架与 RNA 加工修饰的关系。大量研究工作表明，真核细胞中 RNA 的转录和加工均与核骨架有关。

Jackson 等用 $^{3}H-UdR$ 脉冲标记 HeLa 细胞，发现 95% 以上新合成的 RNA 结合于核骨架，说明 RNA 是在核骨架上进行合成的。Volgestin 等(1983)利用雌激素促进鸡输卵管细胞卵清蛋白基因转录活性增高这一实验模型，发现只有活跃转录的卵清蛋白基因才能结合于核骨架上，而不转录的 β 珠蛋白基因不结合；Hentzen 等(1984)则显示成红细胞中正在转录的 β 珠蛋白基因结合于核骨架上。上述研究表明在鸟类和哺乳动物细胞中，具有转录活性的基因是结合在核骨架上的；RNA 聚合酶在核骨架上具有结合位点；RNA 的合成是在核骨架上进行，基因只有结合在核骨架上才能进行转录。

3. 核骨架与病毒复制

病毒是最简单的生命体，其生命活动必须依赖宿主细胞。现已积累的资料表明胞质病毒的代谢与细胞质骨架有关。近年来发现核内病毒的发生与核骨架有密切关系，首先是发现单纯疱疹病毒的核壳在核骨架上装配。翟中和等(1987)进一步证实了腺病毒(adenovirus)核内 DNA 病毒的复制和装配与核骨架关系密切，作为外源基因的病毒 DNA，其基因表达过程与高等真核细胞自身基因表达有相似的规律，其 DNA 复制、RNA 转录及加工均必须依赖核骨架。

4. 核骨架与染色体构建

在核骨架与 DNA 复制的关系的研究中，发现 DNA 以复制环的形式锚定在核骨架上，而细胞核内如此多的 DNA 复制环与核骨架纤维网如何构建成染色质？核骨架如何参与染色体构建，目前基本上仍是不清楚的，而这是细胞生物学研究中必然要提出的问题。大量研究工作说明 DNA 复制环是真核细胞 DNA 高级结构的基本单位(详见第八章第二节)，但许多细节是不清楚的，尤其是核骨架与染色体骨架的关系及其在细胞周期中的变化还很不清楚。

综上所述，我们提出这样的认识与概念，在细胞核这样小小的空间内，容纳如此多的遗传信息，要有序地进行表达，必须在空间上进行有序的调节。在一定

时间内，细胞核内只有极少数基因在活跃表达，其他基因处于关闭状态，基因的关闭与开放从实验结果看，与其是否在核骨架上锚定有关，基因组在核骨架上锚定后可以为 DNA 解螺旋提供更好的支撑，从而得到更合适的空间，使 DNA 与聚合酶有更多的接触面，为 DNA 的转录提供合理的空间与有利的条件。

二、染色体支架

染色体支架是指染色体中由非组蛋白构成的结构支架。

（一）染色体支架的真实性

自从 Laemmli 等首次报道 HeLa 细胞中期染色体骨架以来（见第八章第二节），关于染色体支架的真实性引起争议。一些人认为染色体支架可能不是真实存在，而是由于染色体中的非组蛋白在制备样品时产生的人工假象。同样，一些作者对银染的染色体轴结构也有怀疑，认为是由于低渗处理使染色体不完全分散造成的密度差所致。

然而，近年来越来越多的工作支持染色体支架是染色体中的真实结构。银染法能选择性地显示染色体轴结构，Howell 和 Hsu(1979)用低渗溶液处理哺乳动物和人的染色体，使表染色体(epichromatin)松散，银染光镜观察发现染色体轴。用 DNA 酶和 RNA 酶处理或用 0.4 mol/L H_2SO_4 处理去除组蛋白，对染色体轴没有影响，用胰蛋白酶消化则染色体轴破坏。说明染色体轴是非组蛋白性的。其后，在减数分裂染色体中也有类似报道。对染色体与染色体支架的银染结果比较分析，银染法所显示的染色体轴确实是染色体支架成分。Earnshaw 和 Laemmli(1984)认为光镜下的银染轴与电镜下观察到的非组蛋白支架(nonhistone protein scaffold)大体上是相对应的结构。

最近，染色体支架/放射环模型在分子水平上得到两个直接证据，说明在高等真核细胞分裂中期染色体中蛋白骨架的客观真实性。首先，大量工作证实，DNA 放射环在高等真核细胞间期核和分裂期染色体中是普遍存在的，DNA 序列在放射环上的排列是非随机的，从前一个细胞周期到下一个细胞周期 DNA 放射环是可以重新形成的(reproduciable)，并在 DNA 放射环上发现了骨架结合区域(scaffold/matrix associated region，SAR/MAR)。上述研究说明 DNA 放射环是染色质中结构和功能单位，并提示非组蛋白骨架是 DNA 放射环的组织者(organizer)。其后，对染色体支架蛋白的研究有了突破，发现 DNA 拓扑酶Ⅱ是一种主要的染色体支架结构蛋白。

（二）染色体支架的成分

染色体支架的成分主要是非组蛋白，最初的研究显示染色体支架含大约 30 种非组蛋白，支架中不含组蛋白。近年来对染色体支架的成分进行了进一步的纯化分析，发现 SCⅠ(Mr 170×10^3)和 SCⅡ(Mr 135×10^3)两种蛋白是染色体支架的主要成分，构成骨架蛋白的 40％以上。后来证实 SCⅠ就是 DNA 拓扑异构酶Ⅱ。Earnshaw 等(1984)研究工作还显示着丝粒蛋白(CENP－B，Mr 80 ×

10^3)和(CENP－C,Mr 140×10^3)位于染色体支架上。

(三) 染色体支架与核骨架的关系

染色体支架与核骨架的关系是一个令人感兴趣的问题,近年来核骨架的研究有了很大进展,一系列工作表明核骨架与DNA复制、RNA转录及加工、染色体构建可能关系密切,核骨架纤维网络为这些功能活动提供了空间支架。在细胞分裂期中,间期核结构发生显著变化,核膜崩解,核纤层解聚,间期染色质凝集形成分裂期染色体,但核骨架在细胞分裂期中的变化及分裂期染色体支架与间期核骨架在结构、成分和功能上的关系尚不清楚。有一些工作提示染色体支架与核骨架中存在相同的蛋白组分,如DNA拓扑异构酶Ⅱ。核骨架的某些结构组分可能在分裂期中转变为染色体支架,而有些模型则完全将核骨架与染色体支架等同起来,但迄今为止实验证据并不充分,分裂期染色体支架与间期核骨架的关系仍是一个悬而未决的问题。如能阐明有丝分裂前期核骨架转变为染色体支架和末期染色体支架转变为核骨架的过程,将有助于全面了解核骨架与染色体支架的关系,同时也有助于对细胞周期中细胞核行为的认识。

染色体支架的研究仅有十余年历史,已取得一系列重要进展,使人们对真核细胞染色体的结构有了新的认识,同时仍有许多问题有待进一步研究,如染色体支架客观真实性的进一步证实,染色体支架与染色体构建的关系(如染色体支架与螺旋模型及放射环模型关系的实验证据)等,染色体支架的研究对于了解真核细胞染色体高级结构的构建及染色质在有丝分裂过程中周期性的凝聚与解凝聚等细胞生物学的基本问题将起重要作用。

三、核纤层

核纤层(nuclear lamina)是位于细胞核内层核膜下的纤维蛋白片层或纤维网络,核纤层由1至3种核纤层蛋白多肽组成(图10－23)。核纤层与中间纤维、核骨架相互连接,形成贯穿于细胞核与细胞质的骨架结构体系。

间期细胞核中,核纤层与核膜在结构上有密切联系,常与核膜组分一起被分离。当用高盐、非离子去垢剂和核酸酶处理核膜后,只有核孔复合体和核纤层存留,核纤层对盐溶液有较大的稳定性,在细胞组分抽提中常与中间纤维、核骨架共同被分离。

(一) 形态结构

在某些真核细胞中,通过超薄切片电镜观察可以直接观察到位于内层核膜与染色质之间的核纤层结构,厚度为30～100 nm,然而,绝大多数细胞的核纤层是很薄的结构。只有将核膜与染色质去除后才能观察到。免疫细胞化学研究说明,核纤层至少在高等真核细胞间期细胞核中是普遍存在的。

核纤层纤维的直径为10 nm左右,纵横排列整齐,呈正交状编织成网络,分布于内层核膜与染色质之间(图10－24)。一般认为核纤层结构整体观呈一球状或笼状网络,切面观呈片层结构。在分裂期细胞,核纤层解体,以蛋白单体形

式存在于胞质中。

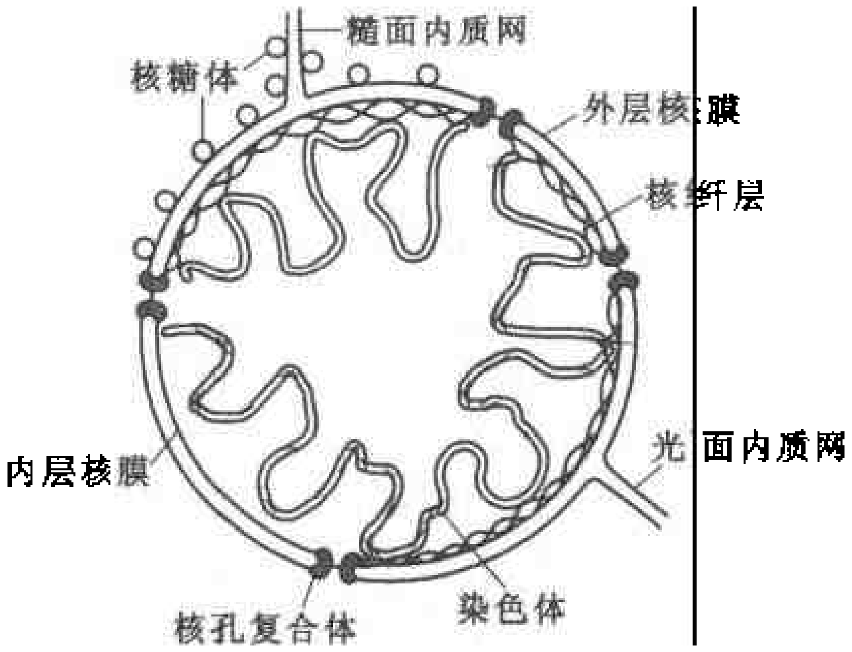


图 10－23　核纤层与细胞核构建
（引自 Gerace，1986）

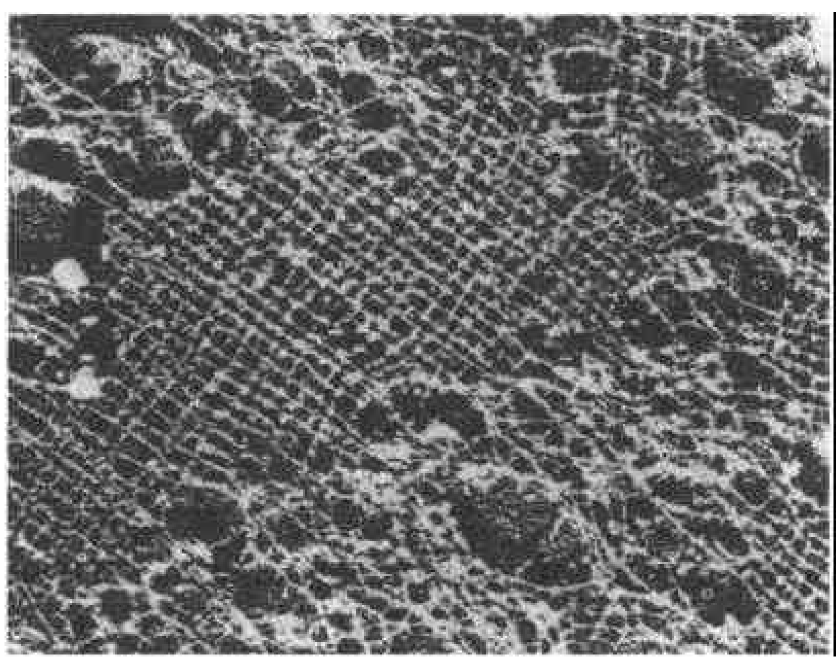


图 10　24　核纤层超微结构
非洲爪蟾卵细胞核膜经 Triton X－100 处理去膜，金属投影显示
核纤层纤维网络（引自 Gerace，1986）

（二）成分

核纤层由核纤层蛋白（lamin）构成，相对分子质量在（60×10^3～80×10^3）之间。蛋白质化学及免疫化学方法分析了多种高等动物的核纤层蛋白，证实其是一个蛋白家族，在哺乳动物和鸟类细胞中，存在 3 种核纤层蛋白，即核纤层蛋白 A（lamin A）、核纤层蛋白 B、核纤层蛋白 C。近年来证实核纤层蛋白 A 与 C 是同一基因的不同加工产物，因此又将核纤层蛋白分为两类：A 型核纤层蛋白：包括核纤层蛋白 A 和 C；B 型核纤层蛋白：核纤层蛋白 B，有几种来源于不同基因的 B 型核纤层蛋白，B1 和 B2 存在于所有体细胞中。在非洲爪蟾中有 4 种，即核纤层蛋白Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ。并在无脊椎动物果蝇细胞中发现两种核纤层蛋白，更有报道

在线虫细胞中发现核纤层蛋白。推测核纤层在真核细胞间期细胞核中是普遍存在的。

（三）核纤层蛋白的分子结构及其与中间纤维蛋白的关系

早在20世纪60年代就知道核纤层具有纤维网状结构，但对其分子基础并不清楚。近年来发现核纤层与中间纤维有许多共同点：① 两者均形成10 nm纤维；② 两者均能抵抗高盐和非离子去垢剂的抽提；③ 某些抗中间纤维蛋白的抗体能与核纤层发生交叉反应，说明中间纤维蛋白与核纤层蛋白分子存在相同的抗原决定簇；④ 两者在结构上有密切联系，核纤层成为核骨架与中间纤维之间的桥梁。两者的生物学功能均不清楚。

从核纤层蛋白A和核纤层蛋白C的cDNA克隆推导出核纤层蛋白的氨基酸顺序，发现在两种多肽的一级结构中有一段长度为350个氨基酸残基的序列与中间纤维蛋白高度保守的α螺旋区有很强的同源性，有28%的氨基酸相同，而核纤层蛋白与波形蛋白之间，在同源岛（homology island）区域有70%的氨基酸相同，其同源性甚至强于不同中间纤维之间的同源程度，说明核纤层蛋白确实是中间纤维蛋白家属成员。在新的中间纤维蛋白家族分类中，核纤层蛋白被确定为第Ⅴ型中间纤维蛋白。将Ⅴ型中间纤维蛋白核纤层蛋白杆状区结构与Ⅰ～Ⅳ型中间纤维蛋白相比较，在螺旋1B区域有一个长度为42个氨基酸残基的插入片段，故核纤层蛋白杆状区较Ⅰ～Ⅳ型中间纤维蛋白杆状区长。螺旋Ⅰ的长度为28 nm，杆状区的长度为52 nm左右。核纤层蛋白分子杆状区的L_1，L_2，L_{12}均为α螺旋结构。Ⅴ型中间纤维蛋白核纤层蛋白C（lamin C）比Ⅰ～Ⅳ型中间纤维蛋白长，含有与核纤层蛋白分子行为有关的氨基酸序列，如核纤层蛋白A第412～422氨基酸序列与核纤层蛋白在细胞核内定位有关，核纤层蛋白分子C端的CaaX（C：cysteine，a：aliphatic，X表示任何氨基酸残基）氨基酸序列进行翻译后异戊二烯化（isoprenylation）和羧甲基化（carboxymethylation）与膜结合有关。CaaX见于所有B型核纤层蛋白及核纤层蛋白A前体，而不存在于成熟的核纤层蛋白A和C。

哺乳动物核纤层蛋白A和核纤层蛋白C的结构和生化分析说明，这两种蛋白各自均能装配成杆状二聚体。电镜观察表明，二聚体由一个约50 nm长的杆部和两个球状头部组成，根据氨基酸序列推测，球状头部由分子的羧基端区域构成，而杆部则由高度保守的α螺旋区构成。体外重组实验表明，核纤层蛋白A和核纤层蛋白C能在体外自我装配成10 nm纤维，其轴向周期性与天然纤维相同（25 nm），且与中间纤维类似（21～23 nm）。因此，可以认为核纤层蛋白具有中间纤维的所有结构特征，无论是单体，还是装配成纤维，确实是中间纤维蛋白家族的成员。

（四）核纤层蛋白在细胞分化中的表达

核纤层蛋白在细胞分化过程中的表达具有细胞特异性，最早发现非洲爪蟾体细胞和卵母细胞含有不同的核纤层蛋白，对胚胎发生和细胞分化过程中核纤层蛋白的表达研究的结果表明（图10－25）：卵母细胞的核纤层蛋白由$L_{Ⅲ}$构成；

卵球成熟过程中，细胞核破裂，L_{III}呈溶解状态；卵受精后，解聚的L_{III}又重新聚合，形成胚胎细胞核内的核纤层结构；早期胚胎中（直至囊胚中期），几乎没有新合成的L_{III}，而L_{I}和L_{II}完全缺失。这些数据说明，卵母细胞中核纤层是胚胎发生早期的核纤层蛋白库。囊胚中期，L_{I}开始表达；而L_{II}在原肠期开始合成，至少在几小时内，几种核纤层蛋白共同构成胚胎细胞核内的核纤层结构。随着发生过程的进行，胚胎细胞核内的L_{III}量逐渐减少，到蝌蚪期用免疫荧光染色在大多数细胞中已检测不到L_{III}。核纤层蛋白的结构主要由L_{I}和L_{II}构成。然而，在胚胎发生后期（47 期），某些体细胞，如神经细胞、肌肉细胞和睾丸支持细胞（Sertoli's Cell），重新开始表达L_{III}，大多数体细胞仅表达L_{I}和L_{II}。

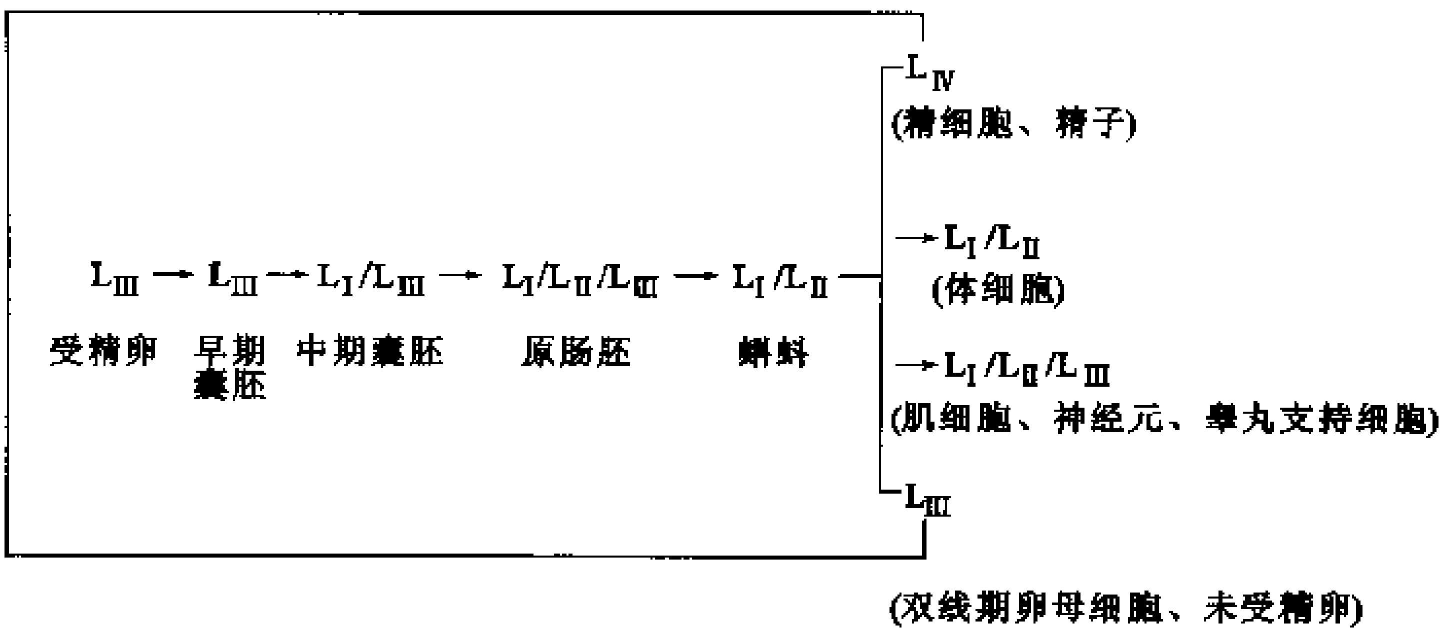


图 10－25　非洲爪蟾胚胎发生过程中核纤层蛋白的表达
（引自 Krohne & Benavente，1986）

非洲爪蟾的配子发生，包括卵子发生和精子发生的过程中，核纤层蛋白的表达亦显示细胞特异性表达。精原细胞和卵原细胞的核纤层由L_{I}和L_{II}组成，在减数分裂粗线期，现今已知的 4 种核纤层蛋白都检测不到，核纤层结构消失，在卵子发生中，核纤层结构于早双线期重现，由L_{III}构成，L_{III}是成熟雌性配子中唯一的核纤层蛋白；在精子发生中，核纤层结构在第二次减数分裂后的精细胞中重现，由L_{IV}构成，L_{IV}仅出现于精细胞和精子中，是雄性配子中所特有的核纤层蛋白。

核纤层蛋白的细胞类型特异性表达不仅见于两栖类，在其他动物如果蝇、鸡和小鼠亦有报道。B 型核纤层蛋白存在于所有体细胞中，而 A 型核纤层蛋白仅见于分化的细胞中。

（五）核纤层在细胞分裂过程中的变化

核纤层最显著的结构重组发生于分裂期，在细胞分裂过程中，核纤层发生解聚和重装配，A 型和 B 型核纤层蛋白在细胞分裂过程中的分布有明显不同，A 型核纤层蛋白在装配核纤层时通过蛋白水解失去 C 端异戊二烯化。分裂前期，核膜崩解，核纤层解聚，A 型核纤层蛋白以可溶性单体形式弥散到胞质中；而 B 型

核纤层蛋白则永久法尼基化(farnesylated),与核膜小泡保持结合状态,分裂末期,当核膜重现时,在染色体周围重装配,形成子细胞的核纤层。细胞分裂期中,核纤层蛋白的磷酸化水平发生显著改变,分裂前期高度磷酸化,而末期则发生去磷酸化,提示磷酸化可能是分裂期中核纤层结构动态变化的调控因素,而核纤层蛋白磷酸化可能是分裂前期细胞内磷酸化级联放大反应的一个重要环节,这种磷酸化级联反应可以在时间上协调许多细胞结构在分裂期的重组。最新的研究表明,核纤层蛋白是促分裂因子(MPF)$p34^{cdc2}$亚基的直接作用底物,$p34^{cdc2}$亚基具蛋白激酶活性,有丝分裂前期,MPF 使核纤层蛋白分子杆状区两端的 Ser22 和 Ser392 磷酸化,直接导致核纤层解聚。采用点突变方法改变这些磷酸化位点可干扰核纤层解聚及核膜崩解。

(六) 功能

核纤层与核膜、染色质及核孔复合体在结构上有密切联系,一般认为核纤层在细胞核中起支架作用,为核膜及染色质提供了结构支架。

核纤层与核膜在结构和功能上的关系是一个令人感兴趣的问题。生化分析发现:① 核纤层蛋白 A,B 和 C 均有亲膜结合作用,而以核纤层蛋白 B 与膜的结合能力最强。A 型核纤层蛋白与染色质的结合能力较 B 型核纤层蛋白强;② A 型核纤层蛋白和 B 型核纤层蛋白合成后均异戊二烯化和羧甲基化,B 型核纤层蛋白的修饰较稳定,而 A 型核纤层蛋白异戊二烯化的 C 端被蛋白酶水解,核纤层蛋白 A 疏水性 C 端被选择性水解可解释为何细胞周期中 B 型核纤层蛋白保持与核膜结合,而核纤层蛋白 A 以可溶性蛋白形式释放到胞质中;③ 内层核膜上存在核纤层蛋白 B 受体(P_{58}),介导核纤层蛋白 B 与核膜结合。在细胞分裂期中,核膜与核纤层的行为密切相关,核膜崩解和核纤层解聚后,核纤层蛋白 B 能选择性地与核膜小泡结合。推测分裂期中核纤层的可逆性解聚与重装配对核膜的崩解与重装配有调节作用,分裂前期核纤层的解聚为核膜崩解形成小泡提供了必要的微环境;分裂期中核纤层蛋白 B 结合在核膜小泡上;分裂末期,当核纤层蛋白去磷酸化与重装配时,直接介导了核膜围绕染色体的重装配,核纤层蛋白将核膜小泡"引导"到染色体表面,经膜融合后构成新核膜。

体外细胞核装配系统为探讨核膜与核纤层的关系提供了良好的实验模型。采用免疫学方法从来源于 CHO 分裂细胞的非细胞体系中选择性去除核纤层蛋白 A 和 C 或核纤层蛋白 B,能诱导核膜和核孔复合体围绕染色体装配的广泛抑制。采用显微注射方法将核纤层蛋白抗体注射人分裂期 PtK_2 细胞,抑制核纤层重装配,结果阻断了分裂末期染色体解旋,染色体保持凝聚状态。Newport (1987)根据体外细胞核装配实验及其他相关实验证据,提出一个细胞核装配模型(图 10-26)。细胞核装配的基本步骤是:① 2 nm 的 DNA 双螺旋与组蛋白 8 聚体形成核小体;② 以 6 个核小体为单位盘绕为直径为 30 nm 的螺线管;③ 30 nm 螺线管形成 DNA 复制环结合于核骨架上,骨架蛋白中可能有 DNA 拓扑异构酶Ⅱ组分,此时的染色质类似于中期染色体,染色质处于凝聚状态;④ 在此基础上,染色质发生构象改变或被修饰,能与核纤层蛋白结合;进而与核膜小泡结

合；⑤ 一旦核纤层和核膜包绕染色体，进一步的体积扩增与核膜小泡融合有关，核膜小泡融合形成双层核膜；⑥ 染色质解凝聚，核体积进一步扩增，DNA 拓扑异构酶的活性与染色质解凝聚有关。当然，这一模型在很大程度上是推理性的，有待大量实验验证。

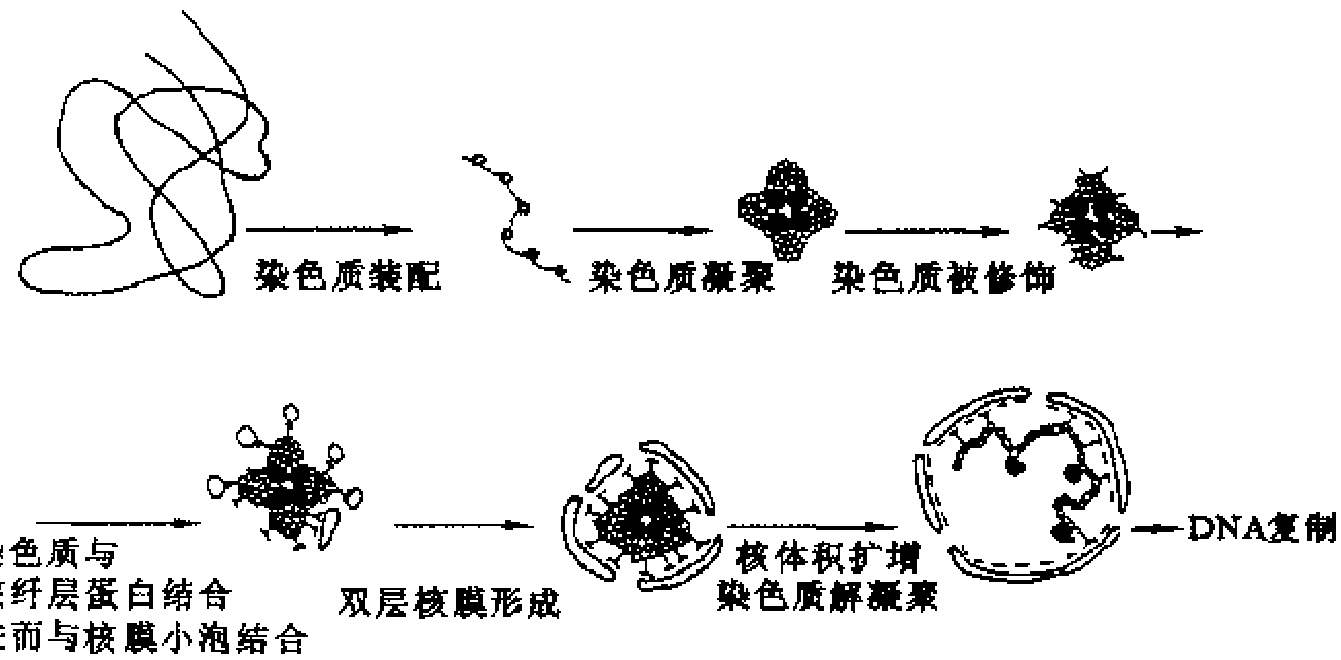


图 10－26　细胞核装配模型
（引自 Newport，1987）

提　　要

细胞骨架是指真核细胞中的蛋白纤维网架体系。广义的细胞骨架包括细胞核骨架（核内骨架及分裂期染色体支架和核纤层）、细胞质骨架（微丝、微管、中间纤维）、细胞膜骨架和细胞外基质。狭义的细胞骨架仅指细胞质骨架。

微丝，又称肌动蛋白纤维，是指真核细胞中由肌动蛋白组成，直径为 7 nm 的骨架纤维，参与肌肉收缩、变形运动、胞质分裂等活动。

微管是由微管蛋白装配成的长管状细胞骨架结构，平均外径为 24 nm，对低温、高压和秋水仙素敏感。细胞内微管呈网状或束状分布，并能与其他蛋白共同装配成纺锤体、基粒、中心粒、鞭毛、纤毛、轴突、神经管等结构，参与细胞形态的维持、细胞运动和细胞分裂。

中间纤维的直径为 10 nm，介于粗肌丝和细肌丝之间，主要有：① 角蛋白纤维；② 波形纤维；③ 结蛋白纤维；④ 神经元纤维；⑤ 神经胶质纤维等，其分布具有组织特异性，与细胞分化有关。

细胞核骨架是存在于真核细胞核内的以蛋白成分为主的纤维网架体系。狭义的核骨架仅指核内基质，即细胞核内除核膜、核纤层、染色质、核仁和核孔以外的以纤维蛋白成分为主的纤维网架体系；广义的核骨架包括核基质、核纤层和核孔复合体。核骨架与基因的复制及表达、细胞核及染色体的构建有关。

染色体支架是指染色体中由非组蛋白构成的骨架，与染色体高级结构有关，

DNA 放射环的根部结合在染色体支架上。

核纤层是位于细胞核内层核膜下的纤维蛋白片层或纤维网络，核纤层由 1～3 种核纤层蛋白多肽组成。核纤层蛋白是中间纤维蛋白家族的成员。

思考题

1. 通过细胞骨架一章的学习，你对生命体的自装配原则有何认识？

2. 除支持和运动外，细胞骨架还有什么功能？怎样理解"骨架"的概念？

3. 细胞中同时存在几种骨架体系有什么意义？是否是物质和能量的一种浪费？

4. 怎样证实细胞中是否存在某一类骨架结构或组分？可应用哪些实验方法？

5. 在细胞骨架的研究中，特异性工具药起了什么作用？假使能发现一种中间纤维特异性工具药，可用来解决哪些问题？试设计一两个实验说明之。

6. 为什么说细胞核中的骨架结构是必需的？核骨架与染色体骨架有何区别与联系？

7. 细胞核骨架为什么长期为人们所忽视，从中你得到了什么启发？

参考文献

1. Thomas Kreis and Ronald Vale. Guidebook to the Cytoskeletal and motor Proteins. Oxford and New York: Oxford University press, 1993

2. Lodish, *et al*. Moleculer Cell Biology. New York and Oxford: Scientific American Books, Inc., 1995

3. Albert, *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publshing Inc., 1998

4. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编．细胞生物学．第二版．北京：北京师范大学出版社，1998

5. Beat Ludin and Andrew Matus. GFP illuminates the Cytoskeleton. trends in Cell Biology, 1998(8): 72～77

6. Jeffrey A Nickerson. The Malignant Alteration of Nuclear Architecture. Jurnal et Cellular Biochemistry, 1998(70): 172～180

第十一章

细胞增殖及其调控

细胞增殖是细胞生命活动的重要特征之一。细胞种类繁多,生命过程有长有短。但最终命运无外乎两种:其一,细胞分裂(cell division),由原来的一个亲代细胞(mother cell)变为两个子代细胞(daughter cell);其二,细胞死亡(cell death),生命活动消失。细胞分裂和细胞死亡均为细胞生命活动的基本特征。各种细胞在分裂之前,还必须进行一定的物质准备。物质准备和细胞分裂是一个相互连续的过程,这一过程即为细胞增殖(cell proliferation)。

细胞增殖是生物繁育的基础。单细胞生物,如酵母,细胞增殖将直接导致生物个体数量的增加。自然界中,由于各种因素的作用,每时每刻都会有大量的生物个体消亡,尤其是那些个体小,结构比较简单的单细胞生物。这些单细胞生物要保持物种的存在,必须依赖大量的细胞增殖,增加个体数量。多细胞生物是由许多单细胞有机结合在一起而形成的生物体。这种多细胞生物体往往是由一个单细胞即受精卵分裂发育而来。它的产生,肯定需要许多次甚至无数次的细胞增殖,并经过复杂的细胞分化过程。但不管细胞增殖次数多少,细胞分化如何复杂,不难看出细胞增殖也是多细胞生物繁殖的基础。

成体生物仍然需要细胞增殖,以弥补代谢过程中的细胞损失。就我们人体而言,每天都会有大量的细胞衰老死亡,如皮肤细胞、血细胞、肠上皮细胞等等。要维持细胞数量的平衡和机体的正常功能,必须依赖细胞增殖。另外,机体创伤愈合、组织再生、病理组织修复等,都要依赖细胞增殖。

细胞增殖受到严密的调控机制所监控。任何细胞,不管是简单的单细胞,还是高等生物体内的细胞,其增殖过程都必须遵循一定的规律。例如,遗传物质DNA在没有复制之前,细胞不能分裂;在DNA复制准备阶段尚未完成之前,DNA不能开始复制等等。在细胞增殖过程中,任何一个关键步骤的错误,都有可能导致严重后果,乃至细胞死亡。在高等生物中,细胞增殖调控更为复杂。它不仅要遵循细胞自身的增殖调控规律,同时还要遵守生物体整体调控机制的调节。不然,不受约束而生成的细胞将被机体免疫系统所清除,或者癌变,威胁整个生命。由此可见,细胞增殖调控是整个生命活动的最基本保证。

本章将重点介绍细胞增殖过程及其调控机制。

第一节　细胞周期与细胞分裂

一、细胞周期

（一）细胞周期概述

如前所述，细胞在分裂之前，必须进行各种必要的物质准备，然后才能进行细胞分裂。细胞分裂前重要的物质准备之一是遗传物质载体DNA的复制。而且，DNA的复制必须正确和彻底。否则，就可能导致细胞死亡，或者细胞周期调控紊乱，如细胞恶性增殖和肿瘤发生。除了遗传物质准备之外，所有其他细胞物质也必须进行积累。这些物质的积累如不及时，有的也可以置细胞于死地。物质准备不仅包括这些物质在数量上的积累，同时也包括它们被及时地装配成需要的结构或者被修饰到一定的分子结构和功能状态。如新复制的DNA和新合成的组蛋白必须装配成染色质，中心体物质准备之后必须装配成新的中心体等。这些必要的结构如果装配不完全或者不正常，细胞也不能正常分裂，最终将导致细胞死亡。由此可见，细胞分裂的物质准备过程是一个十分复杂而又必须精确的生命活动过程。

经过物质准备之后，细胞开始进行分裂。细胞分裂过程也是一个十分复杂而又必须精确的生命过程。如果细胞分裂过程紊乱，如染色体包装不正常、染色体运动失调、遗传物质不能平均分配到两个子细胞中等等，也将导致细胞的死亡。然而，我们也必须知道，与遗传物质相比，有些物质则显得不是十分必要，如某些细胞质成分，这些物质如不能平均分配到两个子细胞中，常常不会对细胞产生致命威胁。子代细胞形成之后，又将开始新一轮的物质积累，准备下一轮的细胞分裂。如此周而复始，细胞的数量不断增加。这种细胞物质积累与细胞分裂的循环过程，称为细胞周期(cell cycle)。从一次细胞分裂结束开始，经过物质积累过程，直到下一次细胞分裂结束为止，称为一个细胞周期。一个细胞周期即是一个细胞的整个生命过程，即由一个老的细胞变成了两个新的细胞。因而，细胞周期有时也称为细胞生活周期(cell life cycle)或细胞繁殖周期(cell reproductive cycle)。人们最初从细胞形态变化考虑，将细胞周期简单地划分为两个相互延续的时期，即细胞有丝分裂期(mitosis)和位于两次分裂期之间的分裂间期(interphase)。分裂间期是细胞增殖的物质准备和积累阶段，分裂期则是细胞增殖的实施过程。细胞经过细胞分裂间期和细胞分裂期，完成一个细胞周期，细胞数量也相应地增加一倍。

20世纪50年代初，人们用^{32}P标记蚕豆根尖细胞并作放射自显影实验，发现DNA合成是在分裂间期中的某个特定时期进行的。这一特定时期称为DNA合成期(DNA synthesis phase，简称S期)。进一步研究发现，S期即不在分裂间期的开始，也不在分裂间期的末尾，而是在其中间某个时期。因而，在S期之前

与上次细胞分裂之后，必然存在一个时间间隔(Gap)。人们称这一时间间隔为第一时间间隔期，简称为 G_1 期；在 S 期后与细胞分裂之前，也必然存在一个时间间隔。人们将这一时间间隔期称为第二时间间隔期，简称为 G_2 期。由此可见，一个细胞周期可以人为地划分为先后连续的 4 个时期，即 G_1 期、S 期、G_2 期和 M 期。绝大多数真核细胞的细胞周期都包含这 4 个时期，只是时间长短有所不同。因而，通常将含有这 4 个不同时期的细胞周期称为标准的细胞周期(standard cell cycle)(图 11－1)。细胞周期中的各个时期也常称为时相。

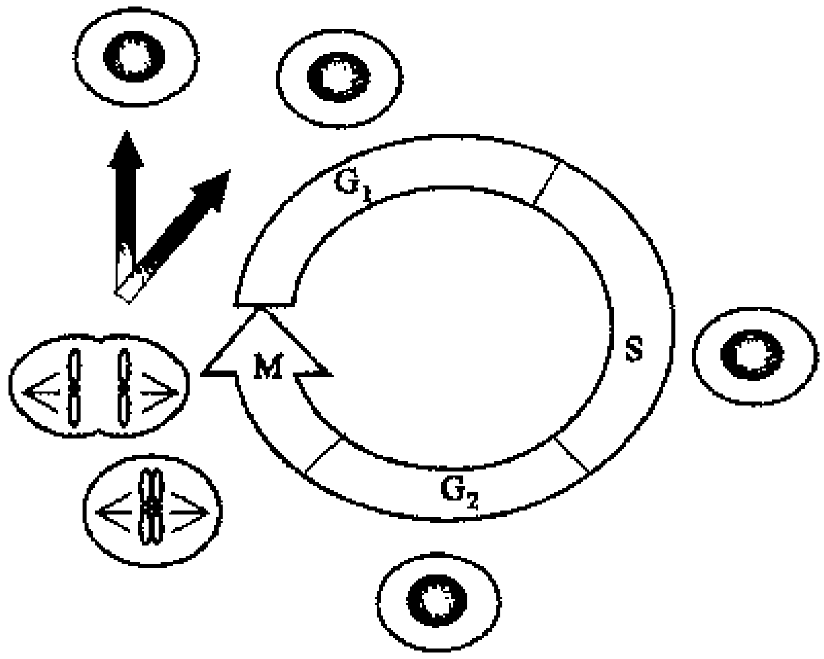


图 11－1 标准的细胞周期

一个标准的细胞周期一般包括 4 个时期：DNA 合成期(S)，细胞分裂期(M)和介于两者之间的 G_1 期和 G_2 期；细胞周期从 G_1 期开始，到 M 期结束

同种细胞之间，细胞周期时间长短相似或相同；不同细胞种类之间，细胞周期时间长短常差别很大。自然界细胞种类繁多，有的细胞每增殖一次仅需几十分钟，如细菌，有的需要十几小时或几十小时，有的长达几十年，如高等动物体内的细胞。就高等生物体的细胞而言，细胞周期时间长短主要差别在 G_1 期，而 S 期、G_2 期和 M 期的总时间相对恒定。尤其是 M 期持续的时间更为恒定，常常仅持续半小时左右。

多细胞生物，尤其是高等生物，可以看作是由一个受精卵经过许多次分裂分化所形成的细胞社会。在这个细胞社会中，有些细胞可能会持续分裂，即细胞周期持续运转。这些细胞常称为周期中细胞(cycling cell)。如上皮组织的基底层细胞，通过持续不断的分裂，增加细胞数量，弥补上皮组织表层细胞死亡脱落所造成的细胞数量损失。也有些细胞会暂时离开细胞周期，停止细胞分裂，去执行一定的生物学功能。这些细胞称为静止期细胞(quiescent cell)，或 G_0 期细胞(图 11－2)。周期中细胞转化为 G_0 期细胞多发生在 G_1 期。

G_0 期细胞一旦得到信号指使，会快速返回细胞周期，分裂增殖，如结缔组织中的成纤维细胞，平时并不分裂，一旦所在的组织部位受到伤害，它们会马上返回细胞周期，分裂产生大量的成纤维细胞，分布于伤口部位，促使伤口愈合。体

外培养的细胞，在某些营养物质缺乏时，也可以进入 G_0 期。此时的细胞仅可以生存，但不能进行分裂。一旦得到营养物质补充，很快会重返细胞周期，开始细胞分裂。对 G_0 期细胞的生成和它们重返细胞周期的机制研究，已越来越受到人们的重视，这不仅涉及到对细胞分化和细胞增殖调控过程的探讨，而且对生物医学如肿瘤发生和治疗，药物设计和药物筛选等，都具有重要的指导意义。在机体内另有一些细胞，由于分化程度很高，一旦生成后，则终生不再分裂。这些细胞称为终末分化细胞。如大量的横纹肌细胞，血液多型核白细胞，某些生物的有核红细胞等。G_0 期细胞和终末分化细胞的界限有时难以划分，有的细胞过去认为属于终末分化细胞，目前可能被认为是 G_0 期细胞。

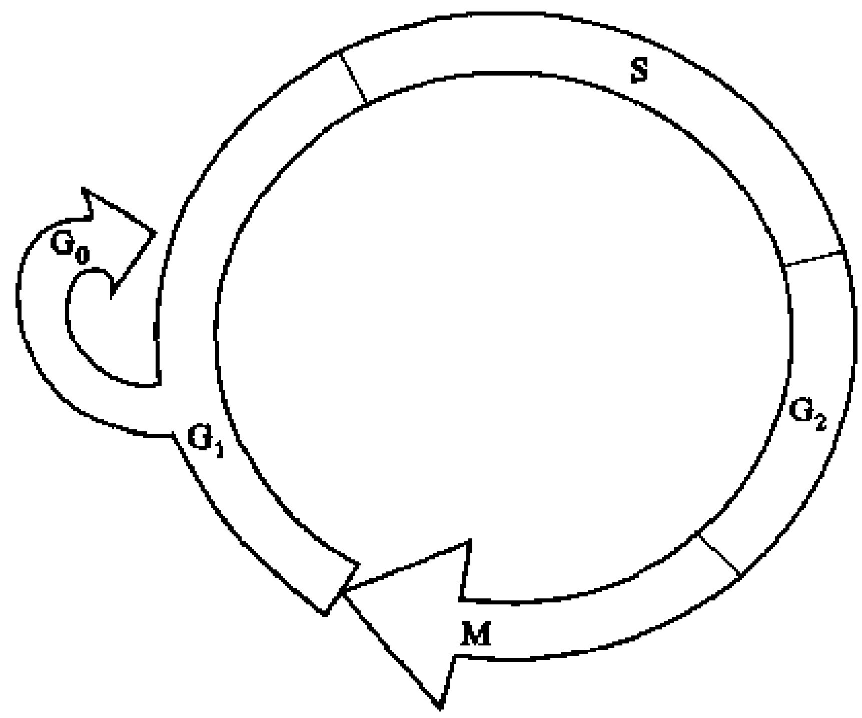


图 11－2　细胞周期 G_0 期

细胞分裂之后，某些细胞离开细胞周期，执行某种生物学功能或进行细胞分化；当受到某种适当的刺激后，它们会重返细胞周期，进行分裂增殖

（二）细胞周期中各个不同时期及其主要事件

1．G_1 期

G_1 期是一个细胞周期的第一阶段。上一次细胞分裂之后，子代细胞生成，标志着 G_1 期的开始。新生成的子代细胞立即进入一个细胞生长时期，开始合成细胞生长所需要的各种蛋白质、糖类、脂质等，但不合成 DNA。在 G_1 期的晚期阶段有一个特定时期。如果细胞继续走向分裂，则可以通过这个特定时期，进入 S 期，开始合成 DNA，并继续前进，直到完成细胞分裂。在芽殖酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中，这个特定时期被称为起始点（start）。起始点过后，细胞开始出芽，DNA 也开始复制。起始点最初的概念是指细胞出芽的开始，但事实上控制着新一轮细胞周期的运转。在其他真核细胞中，这一特定时期称为限制点（restriction point，R 点），或检验点（checkpoint）。

起始点被认为是 G_1 期晚期的一个基本事件。细胞只有在内在和外在因素共同作用下才能完成这一基本事件，顺利通过 G_1 期，进入 S 期并合成 DNA。任

何因素影响到这一基本事件的完成,都将严重影响细胞从 G_1 期向 S 期转换。影响这一事件的外在因素主要包括营养供给和相关的激素刺激等;而内在因素则主要是一些与细胞分裂周期基因(cell division cycle gene,*cdc* 基因)调控过程相关的因素。*cdc* 基因的产物是一些蛋白激酶、磷酸酶等。这些酶活性的变化将直接影响到细胞周期的变化。而这些酶活性变化本身又受到内在和外在因素的立体调节。

限制点的概念多用于高等真核细胞,尤其是哺乳动物细胞。其实质尚不完全清楚,但已发现与酵母中的起始点在形式上有许多共同之处,但也有明显不同,可能比后者更为复杂。实验发现,绝大多数细胞若在限制点前进行无生长因子培养(growth factor starvation),细胞会很快进入休眠期,不能复制 DNA,也不能进行细胞分裂。倘若在限制点之后进行无生长因子培养,细胞则可以进入 S 期,复制 DNA。

检验点是目前细胞周期研究领域中用得较多的一个术语。这一术语的出现可能源于早期对大肠杆菌 *E.coli* DNA 复制调控的研究。当 *E.coli* DNA 受到损伤,或 DNA 复制受到抑制时,会激活 RecA 蛋白,酶解 LexA 抑制因子。诱导 *SOS* 基因的大量表达。有些 *SOS* 基因产物参与受损 DNA 的修复,有些则参与阻止细胞分裂。这种细胞周期进程被抑制的原因并不是 DNA 损伤或 DNA 复制尚未完成本身所引起的,而是由于细胞内存在一系列监控机制(surveillance mechanisms)。这些特异的监控机制可以鉴别细胞周期进程中的错误,并诱导产生特异的抑制因子,阻止细胞周期进一步运行。在真核细胞中也发现多种监控机制。这些监控机制犹如交通路途中设立的检查站,随时检查过往的行人和车辆。因而,这些监控机制称为检验点。检验点不仅存在于 G_1 期,也存在于其他时期,如 S 期检验点、G_2 期检验点、纺锤体装配检验点等。近几年,检验点这一术语被广泛应用。

2. S 期

S 期即 DNA 合成期。细胞经过 G_1 期,为 DNA 复制的启始做好了各方面的准备。进入 S 期后,立即开始合成 DNA。DNA 复制的起始和复制过程受到多种细胞周期调节因素的严密调控。同时,DNA 复制与细胞核结构如核骨架、核纤层、核膜等密切相关。目前已经知道,真核细胞 DNA 的复制和原核生物一样,是严格按照半保留复制的方式进行的。真核细胞新合成的 DNA 立即与组蛋白结合,共同组成核小体串珠结构。新的组蛋白也是在 S 期合成的。关于真核细胞 DNA 复制的起始、复制过程及其调控机制等,目前已取得了许多突破性进展;DNA 复制与细胞核结构的关系等,也在积极研究之中。

3. G_2 期

DNA 复制完成以后,细胞即进入 G_2 期。此时细胞核内 DNA 的含量已经增加一倍,由 G_1 期的 $2n$ 变成了 $4n$,即每个染色体含有 4 个拷贝的 DNA。其他结构物质和相关的亚细胞结构也已进行了进入 M 期的必要准备。通过 G_2 期后,细胞即进入 M 期。但细胞能否顺利地进入 M 期,要受到 G_2 期检验点的控制。

G_2 期检验点要检查 DNA 是否完成复制，细胞是否已生长到合适大小，环境因素是否利于细胞分裂等。只有当所有有利于细胞分裂的因素得到满足以后，细胞才能顺利实现从 G_2 期向 M 期的转化。

4．M 期

M 期即细胞分裂期。真核细胞的细胞分裂主要包括两种方式，即有丝分裂(mitosis)和减数分裂(meiosis)。体细胞一般进行有丝分裂；成熟过程中的生殖细胞进行减数分裂，也称为成熟分裂。减数分裂是有丝分裂的特殊形式。细胞经过分裂，将其遗传物质载体平均分配到两个子细胞中。关于细胞分裂过程，下面将进一步介绍。

（三）细胞周期长短测定

细胞种类众多，繁殖速度有快有慢，细胞周期长短差别很大。单细胞生物是如此，多细胞生物也是如此。就人体细胞而言，如神经细胞、肌肉细胞、血细胞、肝细胞、小肠上皮细胞等等，其生长繁殖速度差异很大。有的细胞的细胞周期可以长达十几年甚至几十年，有的则可以短至几天或几小时，甚至几十分钟。体外培养的细胞也是如此，细胞来源不同，其细胞周期长短各异。细胞周期长短与细胞所处的外界环境也有密切关系。就环境温度而言，在一定范围之内，温度高，细胞分裂繁殖速度加快，温度低，则分裂繁殖速度减慢。

在某些工作中，常常会涉及到细胞周期时间长短的测定。关于细胞周期时间长短的测定工作，已有几十年的历史。测定方法也多种多样。在此仅介绍两种常用方法。依此即可以测定细胞周期总时间，也可以测定细胞周期中各个时期所持续的时间。

1．脉冲标记 DNA 复制和细胞分裂指数观察测定法

这是一种建立较早且被广泛采用的方法。这种方法主要适用于细胞种类构成相对简单，细胞周期时间相对较短，周期运转均匀的细胞群体。下面以体外培养细胞为例，简单介绍其实验过程和结果分析(图 11－3)。首先，应用 ^3H－TdR 短期饲养细胞，数分钟至半小时后，将 ^3H－TdR 洗脱，置换新鲜培育液并继续培养。随后，每隔半小时或一小时定期取样，作放射自显影观察分析，从而确定细胞周期各个时相的长短。其结果分析方法如图 11－3B 所示。经 ^3H－TdR 短暂标记后，凡是处于 S 期的细胞均被标记。置换新鲜培养液后培养一定时间，被标记的细胞将陆续进入 M 期。最先进入 M 期的标记细胞是被标记的 S 期最晚期细胞。所以，从更换培养液培养开始，到被标记的 M 期细胞开始出现为止，所经历的时间为 G_2 期时间(T_{G_2})。从被标记的 M 期细胞开始出现，到其所占 M 期细胞总数的比例达到最大值时，所经历的时间为 M 期时间(T_M)。从被标记的 M 期细胞数占 M 期细胞总数的 50％开始，经历到最大值，再下降到 50％，所经历的时间为 S 期时间(T_S)。从被标记的 M 期细胞开始出现并逐渐消失，到被标记的 M 期细胞再次出现，所经历的时间为一个细胞周期总时间(T_C)。T_C 减去 T_{G_2}、T_M、T_S 后所剩余的时间即为 T_{G_1}。在实际工作中，期望值和工作值往往会

有一些出入。图 11－3B 中折线表示期望值，点虚线表示工作值。

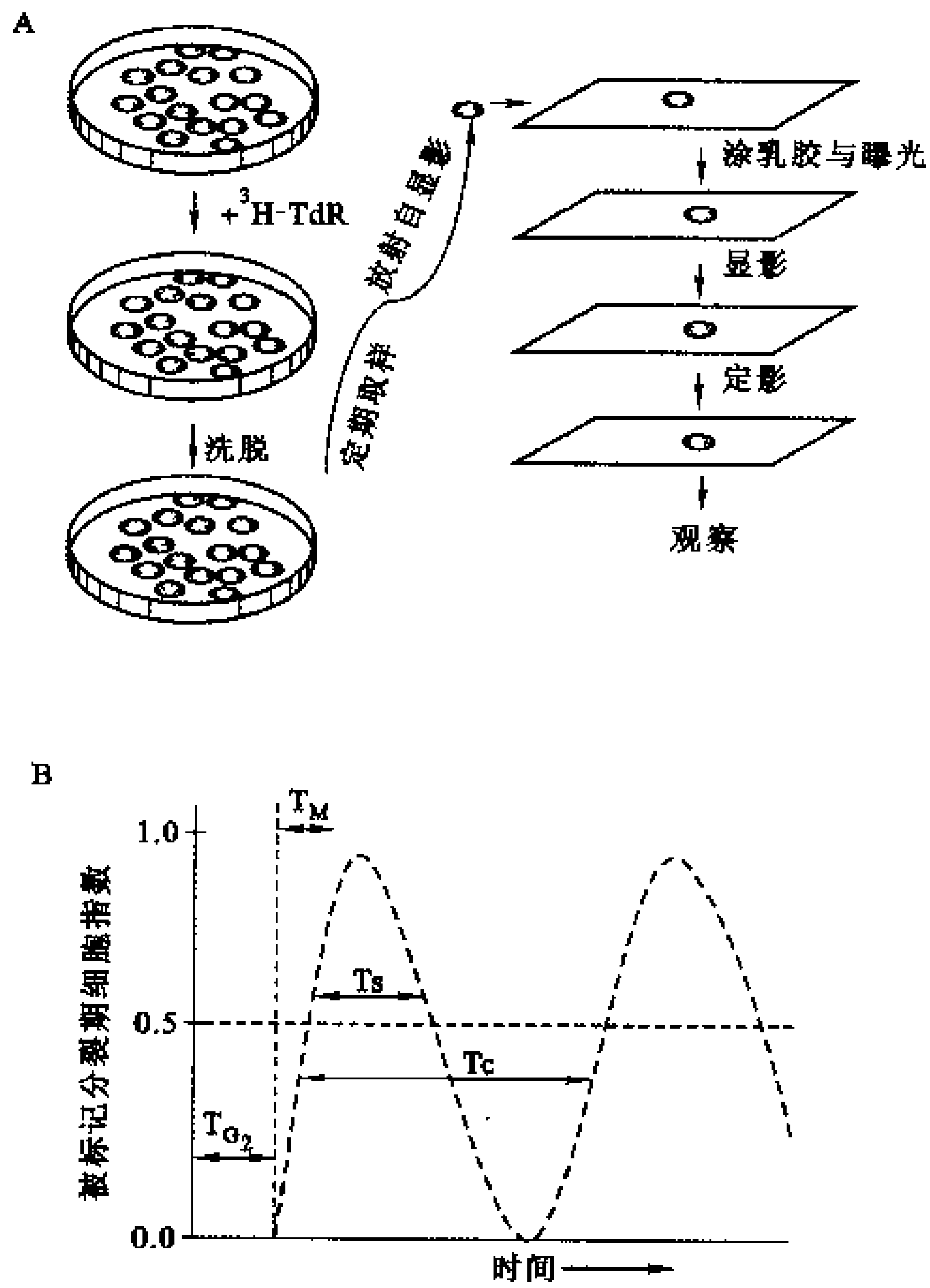


图 11－3　放射性同位素脉冲标记法测定细胞周期时间

A：用放射性同位素^{3}H－TdR 标记细胞；B：放射自显影结果分析

用^{3}H－TdR 标记法测定细胞周期时间长短是一种经典方法。其优点是不仅可以测定细胞周期总时间，而且可以同时测出各个时期所持续的时间，其结果分析直截了当。但缺点也比较突出，首先，应用放射性同位素要求专门设备，实验操作也需要格外小心谨慎，以免造成放射性物质对操作者的伤害和对周围环境的污染。放射性同位素本身对细胞周期也有一定干扰，且不可避免。目前，可以采用 BrdU 取代^{3}H－TdR 标记细胞，检测被标记的细胞可用抗 BrdU 抗体作免疫细胞化学染色。

不管是用^{3}H－TdR 还是用 BrdU 进行标记，此方法在某些情况下都将表现出明显不足。即当细胞群体组成复杂，有的细胞的细胞周期时间短，有的时间长，有的处于静止期等。因而很难得到规则的工作曲线，更难以得到正确的细胞周期时间。

2．流式细胞分选仪测定法

流式细胞分选仪是一种快速测定和分析流体中细胞或颗粒物各种参数的大型实验仪器。它可以逐个地分析细胞或颗粒物的某个参数，也可以结合各种细胞标记技术，同时分析多个参数，如细胞种类、DNA、RNA、蛋白质含量以及这些物质在细胞周期中的变化等。还可以用作对某个细胞群体中的各种细胞进行分拣。

流式细胞分选仪在细胞周期研究中应用广泛。从DNA含量着眼，G_1期和G_2/M期细胞含有固定的DNA含量，分别为1C和2C（2n和4n），S期细胞的DNA含量介于1C和2C之间（图11－4）。应用流式细胞分选仪测定细胞周期，可以通过监察细胞DNA含量在不同时间内的变化，从而确定细胞周期时间长短，也可以通过直接标记DNA复制，如同应用上述放射性同位素标记技术，经过统计细胞数量和被标记的分裂期细胞百分比，对细胞周期进行综合分析（参见Ormerod，1990）。如果应用流式细胞分选仪技术并结合细胞周期同步化，综合分析细胞周期时间，将会使实验结果分析更加简便可靠。例如，应用某些药物处理，将细胞抑制在细胞周期中的某个特定时期。然后，将细胞从抑制中释放出来，所有细胞将会同步运转。应用流式细胞分选仪测定这些细胞的周期时间，实验既简单可靠，同时还可以通过改变某些因素，或加入某些物质，从而研究这些物质因素对细胞周期的影响。

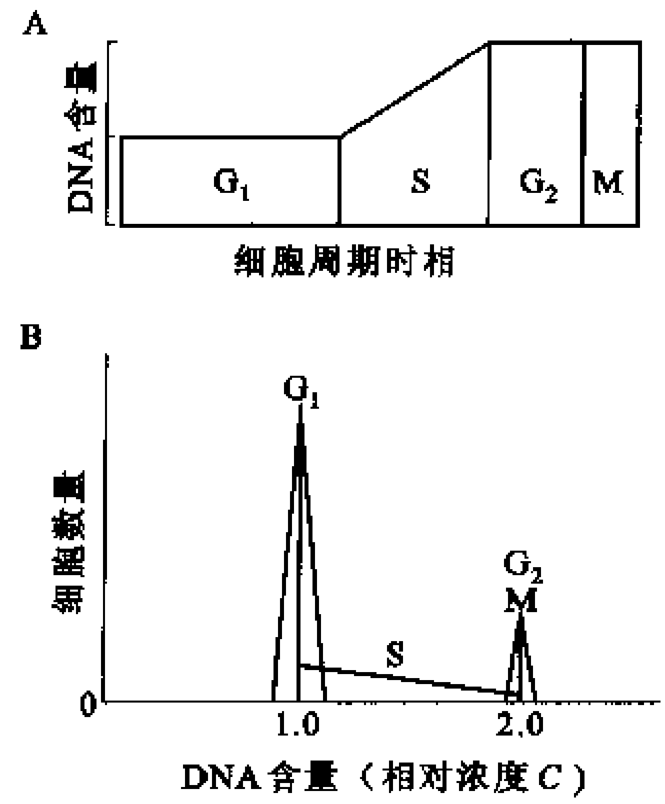


图11－4　流式细胞分选仪测定细胞周期

A：细胞周期中DNA含量变化；B：用流式细胞分选仪测定每个细胞群体的处于不同时期的细胞数量和DNA含量，采用不同时间连续分析，即可综合分析细胞周期及其各个时期的长短

除上述两种方法外，还有其他一些方法。例如，在仅需要测定细胞周期总时间时，只要通过在不同时间里对细胞群体进行计数，就可以推算出细胞群体的倍增时间，即细胞周期总时间。又如，应用缩时摄像技术，不仅可以得到准确的细胞周期时间，还可以得到分裂间期和分裂期的准确时间。

（四）细胞周期同步化

在同种细胞组成的一个细胞群体中，不同的细胞可能处于细胞周期的不同时期，为了某种目的，人们常常需要整个细胞群体处于细胞周期的同一个时期。事实上，在自然界中已经存在一些细胞群体处于细胞周期的同一时期的例子。如，有一种粘菌（*Physarm polycephalum*）的变形体plasmodia，只进行核分裂而不进行细胞质分裂，结果形成多核体结构。所有细胞核在同一细胞质中进行同步分裂，细胞核数量最终可以多达10^8个，细胞直径可达5～6 cm。又如，许多动物

可以一次产下许多均处于细胞周期的同一时期卵细胞。若这些卵细胞同时受精,则可以同时进行卵裂。而且,有不少种类的受精卵可以同步卵裂数次甚至十多次,形成数量可观的同步化细胞群体。这种自然界存在的细胞周期同步过程,称为自然同步化。

细胞周期同步化也可以人工选择或人工诱导,统称为人工同步化。人工选择同步化是指人为地将处于不同时期的细胞分离开来,从而获得不同时期的细胞群体。例如,处于对数生长期的单层培养细胞,细胞分裂活跃,大量处于分裂期的细胞变圆,从培养瓶(皿)壁上隆起,与培养瓶(皿)壁的附着力减弱。若轻轻震荡培养瓶(皿),处于分裂期的细胞即会从瓶(皿)壁上脱落,悬浮到培养液中。收集培养液,通过离心,即可获得一定数量的分裂期细胞。将这些分裂期细胞重新悬浮于一定体积的培养液中培养,细胞即开始同步分裂,并同时进行细胞周期运转,由此可以获得不同时相的细胞(图 11-5)。这种方法目前仍被广泛采用。其优点是,细胞未经任何药物处理,因而未受到任何药物伤害,能够真实反映细胞周期状况,且细胞同步化效率高。但此方法也有不理想之处,即分离的细胞数量少。要获得足够数量的细胞,其成本大大高于采用其他方法。人工选择同步化的另一个方法是密度梯度离心法。有些种类的细胞,如裂殖酵母,不同时期的细胞在体积和重量上差别显著,可以采用密度梯度离心方法分离出处于不同时期的细胞。这种方法简单省时,效率高,成本低。但缺点是,对大多数种类的细胞并不适用。

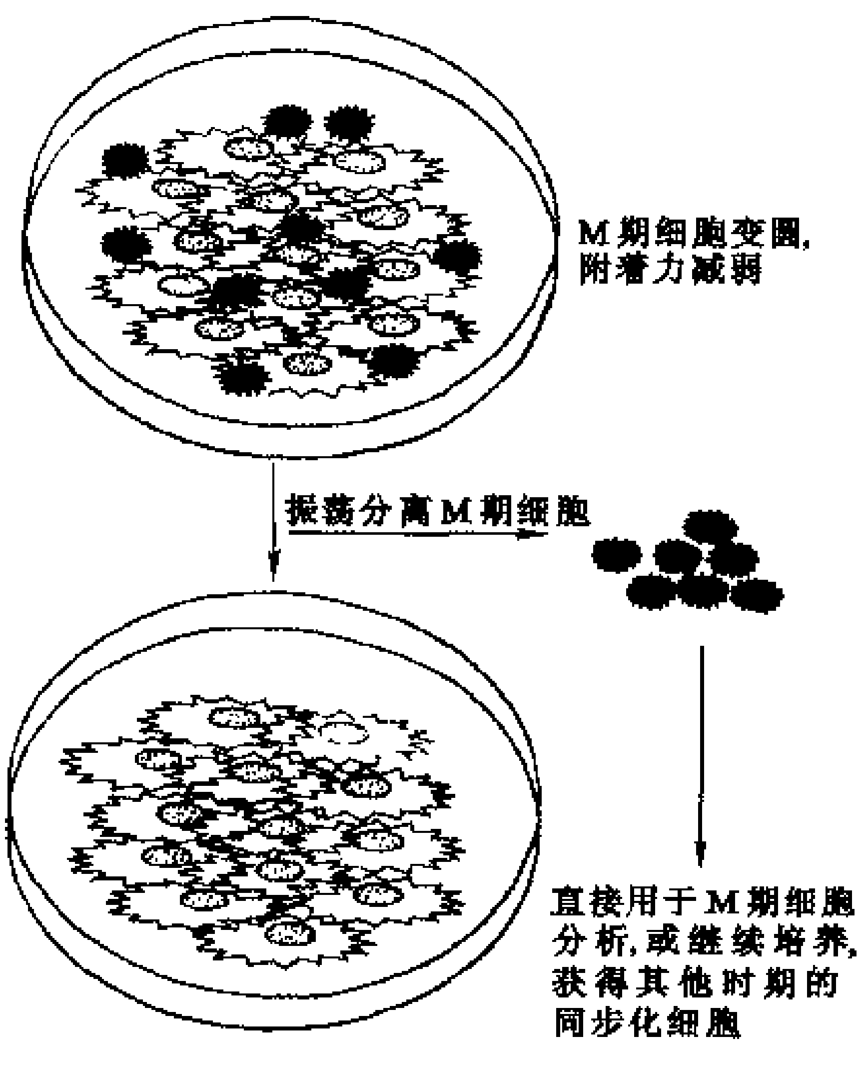


图 11-5　从培养细胞中收集 M 期细胞的同步化方法

细胞同步化可以通过人工诱导而获得，即通过药物诱导，使细胞同步化在细胞周期中某个特定时期。目前应用较广泛的诱导同步化方法主要有两种，即DNA合成阻断法和分裂中期阻断法。

1. DNA合成阻断法

是一种采用低毒或无毒的DNA合成抑制剂特异地抑制DNA合成，而不影响处于其他时期的细胞进行细胞周期运转，从而将被抑制的细胞抑制在DNA合成期的实验方法。目前采用最多的DNA合成抑制剂为TdR和羟基脲(hydroxyurea,HU)。将一定剂量的抑制剂加人培养液并继续培养一定时间($T_{G_2}+T_M+T_{G_1}$)，所有细胞即被抑制在S期。注意，此时的S期细胞可能处于S期中的任何时期，其时间区段仍然较宽。若将抑制剂去除，细胞仍然不能有效地进行同步化运转。要解决这一问题，通常的做法是，采用两次DNA合成抑制剂处理，将细胞最终抑制在G_1/S期交界处狭窄的时间区段。抑制剂去除后，细胞即可以进行同步细胞周期运转(图11－6)。将过量的TdR加入细胞培养液，凡处于S期的细胞立刻被抑制，而其他各期的细胞则照常运转，培养一定时间($T_{G_2}+T_M+T_{G_1}$)后，所有这些细胞则被抑制在G_1/S期的交界处；将TdR洗脱，更换新鲜培养液后，阻断于S期的细胞，开始复制DNA并沿细胞周期运转。再向培养液中第二次加人TdR，经过一定时间的培养，所有细胞则会被抑制在G_1/S期交界处。将TdR洗脱，更换新鲜培养液并继续培养一定时间，即可以获得S期和G_2期不同时间点的同步化细胞。此方法的优点是同步化效率高，几乎适合于所有体外培养的细胞体系。这种方法目前被广泛采用。

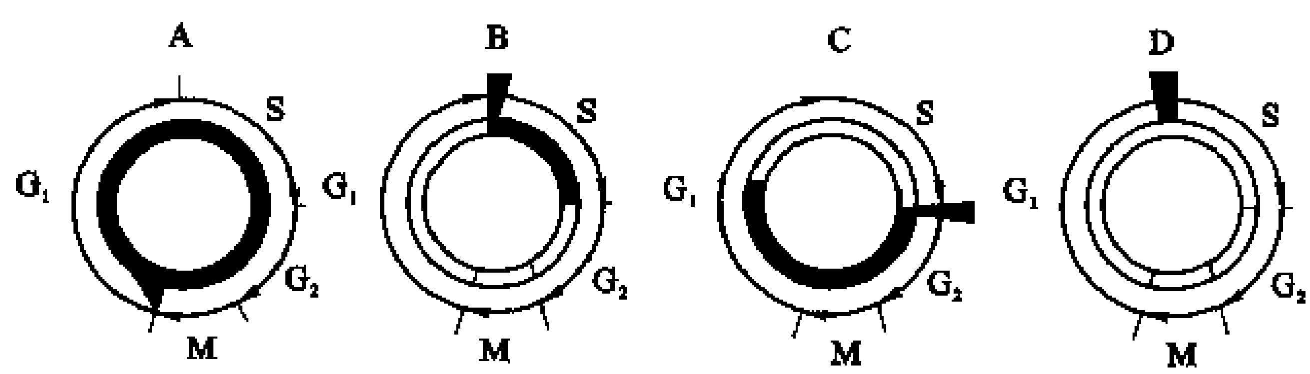


图11－6 应用过量的TdR阻断法进行细胞周期同步化

A：处于对数生长期的细胞；B：第一次加入TdR，所有处于S期的细胞立即被抑制，其他细胞运行到G_1/S交界处被抑制；C：将TdR洗脱，解除抑制，被抑制的细胞沿细胞周期运行；D在解除抑制的细胞到达G_1期终点前，第二次加入TdR并继续培养，所有的细胞被抑制在G_1/S交界处

2. 分裂中期阻断法

某些药物，如秋水仙素、秋水酰胺和nocodazole等，可以抑制微管聚合，因而能有效地抑制细胞分裂器的形成，将细胞阻断在细胞分裂中期。处于间期的细胞，受药物的影响相对较弱，常可以继续运转到分裂期。因而，在药物持续存在的情况下，处于分裂期的细胞数量会逐渐累加。通过轻微振荡，将变圆的分裂期

细胞摇脱，经过离心，可以得到大量的分裂中期细胞。将分裂中期细胞悬浮于新鲜培养液中继续培养，它们可以继续分裂并沿细胞周期同步运转，从而获得 G_1 期不同阶段的细胞。此方法的优点是操作简便，效率高。缺点是这些药物的毒性相对较大，若处理的时间过长，所得到的细胞常常不能恢复正常细胞周期运转。

在实际工作中，人们常将几种方法并用，以获得数量多、同步化效率高的细胞。我们曾用低温、TdR 和 nocodazole 综合处理法获取大量的分裂中期细胞。将这些中期细胞匀浆用来进行非细胞体系细胞核重建实验，获得了体外重建的细胞核，不仅实现了细胞同步化，而且证明这些同步化的 M 期细胞仍可以进行正常的细胞周期运转。

3. 条件依赖性突变株在细胞周期同步化中的应用

如前所述，人们已经分离了许多与细胞周期调控有关的条件依赖性突变株。将这些突变株转移到限定条件下培养，所有细胞便被同步化在细胞周期中某一特定时期。

（五）特异的细胞周期

特异的细胞周期是指那些特殊的细胞所具有的与标准的细胞周期相比有着鲜明特点的细胞周期。应用这些细胞所进行的细胞周期研究，不仅大大简化了实验条件，获得了许多重要结果，加深了人们对细胞周期的认识，而且这些研究仍在深入发展。

1. 早期胚胎细胞的细胞周期

早期胚胎细胞的细胞周期主要指受精卵在卵裂过程中的细胞周期。它与一般体细胞的细胞周期明显不同，尤其是两栖类、海洋无脊椎类以及昆虫类的早期胚胎细胞等。最显著的特点是，卵细胞在成熟过程中已经积累了大量的物质基础，基本可以满足早期胚胎发育的物质需要，其细胞体积也显著增加；当受精以后，受精卵便开始迅速卵裂，卵裂球数量增加，但其总体积并不增加，因而，卵裂球体积将越分越小；每次卵裂所持续的时间，即一个细胞周期所持续的时间，大大短于一个体细胞周期所持续的时间；早期胚胎细胞周期的 G_1 期和 G_2 期非常短，以至认为早期胚胎细胞周期仅含有 S 期和 M 期，即一次卵裂后，新的卵裂球迅速开始 DNA 合成，然后立即开始下一轮卵裂。以非洲爪蟾早期胚胎为例，当卵细胞受精以后，第一个细胞周期，即第一次卵裂，持续时间约 75 min。从第二个细胞周期到第十二个细胞周期，即从第二次卵裂到第十二次卵裂，每个细胞周期仅持续 30 min。十二个细胞周期共需要 8 h 多。而一个非洲爪蟾体细胞的细胞周期持续时间约 24 h。标准细胞周期与早期胚胎细胞周期比较，见图 11－7。

虽然早期胚胎细胞周期有其鲜明的特点，但其基本的细胞周期调控因子和调节机制与一般体细胞标准的细胞周期基本是一致的。在过去的几十年中，人们选用早期胚胎细胞作材料所进行的细胞周期调控研究，多次取得突破性进展，大大推动了学科发展。

2. 酵母细胞的细胞周期

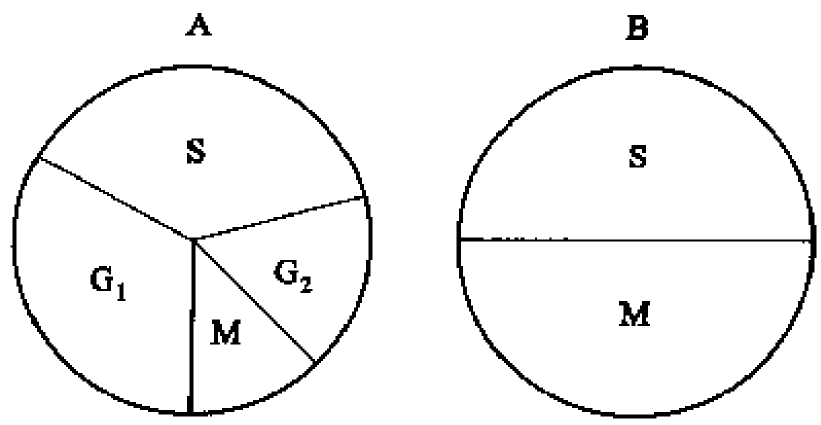


图 11-7　非洲爪蟾体细胞周期和早期胚胎细胞周期比较
A：体细胞标准细胞周期；B：早期胚胎细胞周期

利用酵母细胞所从事的细胞周期研究，在整个细胞周期研究领域中占有重要位置。几十年来，用酵母细胞进行细胞周期调控研究取得了大量的突破性成果，如许多与细胞周期调控直接相关的基因的成功分离等。用于进行细胞周期调控研究的酵母主要包括两种，即芽殖酵母和裂殖酵母（*S. pombe*）。

酵母细胞的细胞周期与标准的细胞周期，有许多相同之处。首先，酵母细胞周期运转过程也包括 G_1 期、S 期、G_2 期和 M 期等 4 个时期。更基本的，酵母细胞周期调控过程与标准的细胞周期非常相似，许多参与调控细胞周期的基因与高等生物也基本相同。

酵母细胞周期也有其明显的特点。首先，酵母细胞周期持续时间较短，大约为 90 min。和许多其他单细胞生物一样，细胞分裂过程属于封闭式，即在细胞分裂时，细胞核核膜不解聚。与细胞核分裂直接相关的纺锤体不是在细胞质中，而是位于细胞核内。此外，还有其他一些特点。例如，和其他真菌相似，酵母在一定环境因素作用下，也进行有性繁殖。

芽殖酵母和裂殖酵母虽同称为酵母，但两者之间的亲缘关系甚远，不仅分属于两个属，据 rRNA 序列分析，两者在两亿年前即已经开始分离。芽殖酵母和裂殖酵母在细胞结构和生命过程方面也有明显差别。

芽殖酵母以出芽方式进行分裂，因而很容易在生活状态下观察细胞周期进程。如图 11-8 所示，芽殖酵母细胞在 G_1 期呈卵圆型，含有一个细胞核，基因组为单倍体。细胞周期起始点位于 G_1 期的后期阶段。起始点过后，细胞马上开始出芽。根据芽体的大小比例可以粗略估计细胞所处的时期。细胞出芽后，很快便进入 S 期，开始 DNA 复制，同时，纺锤体开始装配。纺锤体的两端为纺锤体极体(spindle polar body)。另一个与标准的细胞周期显著不同的是，酵母的纺锤体装配与 S 期 DNA 复制同时进行，而不是在 DNA 复制之后。S 期过后，经过短暂的 G_2 期，染色质开始凝集，纺锤体逐渐延长，细胞逐步向 M 期推进。随着时间延长，芽体也不断增长，细胞核一分为二，分别分配到母体细胞和子细胞芽体中。再经过胞质分裂，形成相互独立的两个细胞。芽殖酵母细胞分裂为不等分裂，即生成的两个细胞体积大小不等，以芽体逐渐形成的子细胞体积较小。

芽殖酵母子细胞形成后，如果环境因素适应，它们可以继续进行下一轮细胞

周期。如果环境因素不适应，如营养物质缺乏等，它们或者直接进入 G_0 期状态，或者改变生活周期，通过有丝分裂方式转化为减数分裂方式进行有性生殖。两个雌雄二倍体细胞接合，细胞质相互融合，细胞核也随之融合，形成一个四倍体细胞。经过起始点和出芽生殖、减数分裂等，最终形成 4 个单倍体孢子。一旦环境因素适应，单倍体孢子又可以萌发，回到无性生殖状态。

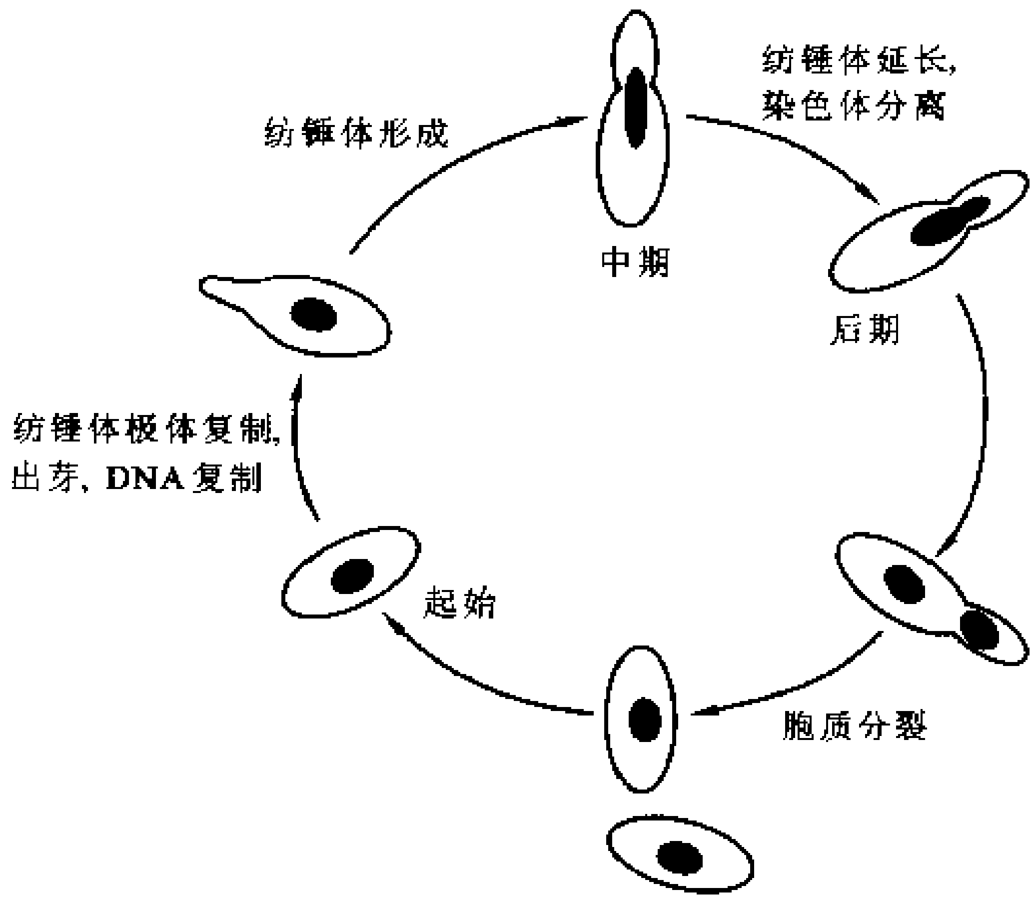


图 11－8　芽殖酵母细胞的细胞周期

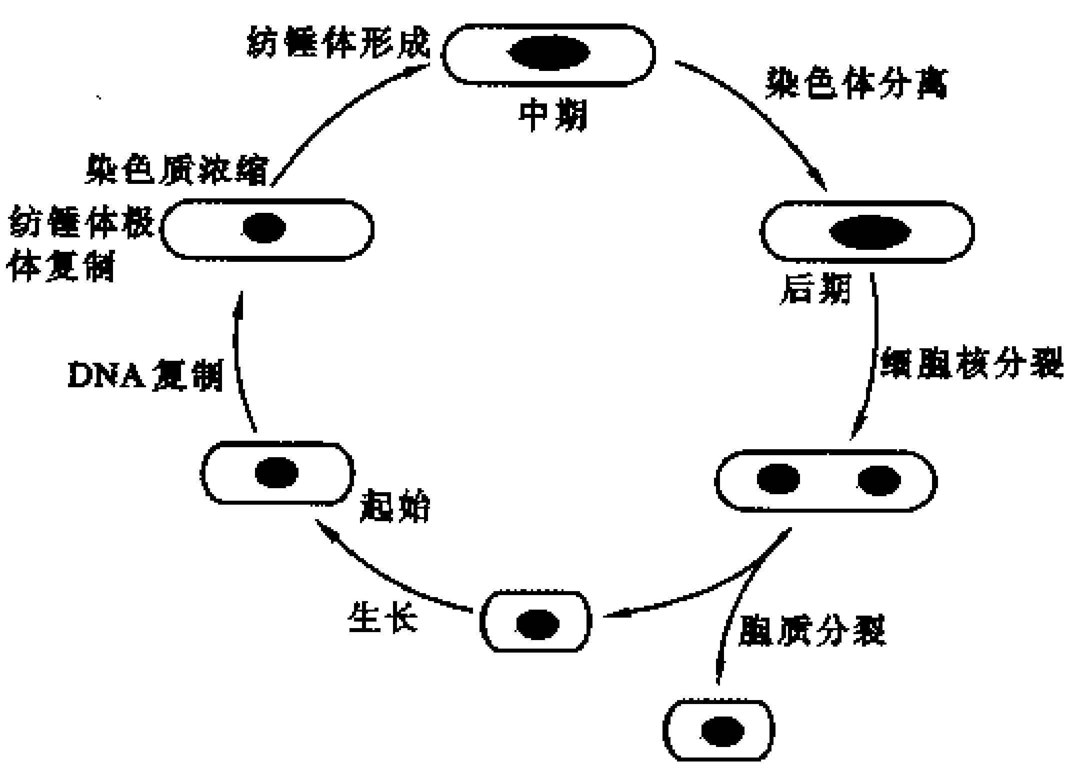


图 11－9　裂殖酵母细胞的细胞周期

裂殖酵母形态呈棒状。其细胞周期与芽殖酵母有不少相似之处，也有显著不同(见图 11－9)。G_1 期裂殖酵母细胞为短棒状。经过一段时间的生长，细胞增加到一定长度，到达起始点。和芽殖酵母相似，经过起始点后，细胞很快进入 S 期，开始复制 DNA，同时继续生长。S 期过后，细胞进入 G_2 期，并将继续生长

一定时间，待细胞达到一定体积后，方能启动 M 期。经染色质凝集，纺锤体极体复制，纺锤体在细胞核内装配并逐渐延长，细胞核拉长等一系列变化，分裂成两个细胞核。再经胞质分裂，形成两个大小相同的子细胞。裂殖酵母在环境因素不利时，也会由有丝分裂生殖转化为减数分裂生殖。但与芽殖酵母细胞不同，两个不同性别的单倍体裂殖酵母细胞可以直接接合，通过减数分裂，形成 4 个单倍体孢子。此外，裂殖酵母的起始点无明显的形态学标志。因而难以像芽殖酵母那样，可以通过观察芽体的大小来估计细胞所在的细胞周期位置。但裂殖酵母有两个鲜明的特点：一是细胞分裂为均等分裂，即分裂后生成的两个细胞大小相等；二是细胞生长仅是细胞长度的增加，细胞直径保持不变。根据这两个特点，可以通过测定细胞长度，比较容易地确定细胞周期变化。

3. 植物细胞的细胞周期

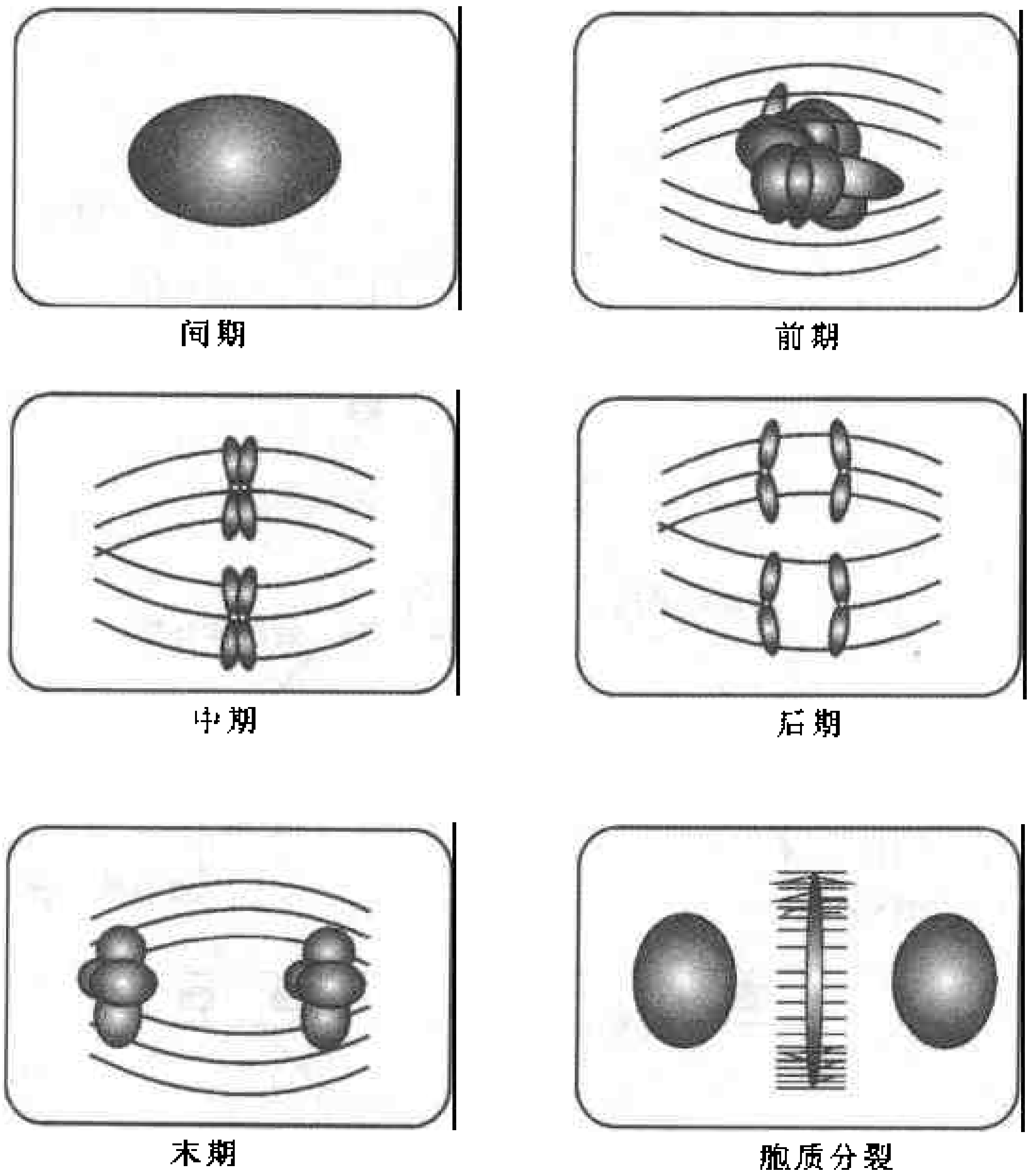


图 11－10　植物细胞的细胞周期

植物细胞的细胞周期与动物细胞的标准细胞周期非常相似，也含有 G_1 期、S 期、G_2 期和 M 期 4 个时期。但植物细胞的细胞周期至少含有两个突出特点（图 11－10）：第一，植物细胞不含中心体，但在细胞分裂时可以正常装配纺锤体。在动物细胞，中心体被认为是微管组织中心，是纺锤体装配所必需的。在缺乏中心体的情况下，是什么因素控制纺锤体装配，长期以来一直是植物细胞周期

研究领域中的重要课题;第二,植物细胞以形成中间板的形式进行胞质分裂。研究植物细胞胞质分裂的调控过程,也是探讨细胞周期调控中的重要课题之一。

4. 细菌的细胞周期

近些年来,研究细菌细胞周期也已成为细胞周期调控研究中重要课题之一。但细菌种类繁多,细胞周期变化很大。在这里仅以大肠杆菌 *E. coli* 为例,简单介绍其细胞周期过程,以供获得对细菌细胞周期的一般认识。

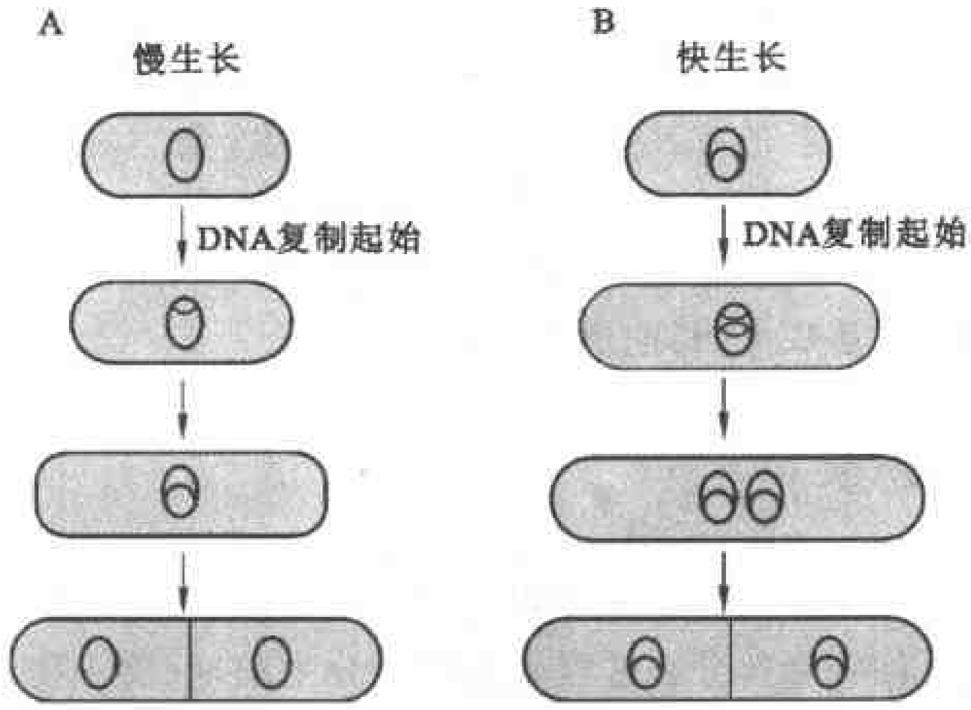


图 11-11 细菌细胞的细胞周期

与所有其他细胞相似,DNA 复制是细菌细胞周期中的重要事件之一(图 11-11)。细菌 DNA 为一环形分子,含有一个复制起始点(origin)。一般情况下,细菌生长缓慢,在 DNA 复制之前,一般要经过一个临界时间(threshold),调节 DNA 复制的起始。在 DNA 复制之后和细胞分裂之前,也有一个临界时间。只有通过这个临界时间,细胞才能开始分裂。从这种慢生长情况来看,细菌细胞周期过程与真核细胞周期过程有一定相似之处。其 DNA 复制之前的准备时间与 G_1 期类似。分裂之前的准备时间与 G_2 期类似。再加上 S 期和 M 期,细菌的细胞周期也基本具备 4 个时期。但是,细菌在快速生长情况下,细胞周期过程有着较大变化。最主要的变化在于细胞如何协调快速分裂和最基本的 DNA 复制速度之间的矛盾。在快速生长情况下,细菌细胞每分裂一次(即一个细胞周期时间)仅需要 35 min,而完成一次 DNA 复制却需要 40 min。而且,在 DNA 复制之前,需要 10 min 的复制起始准备,在 DNA 复制之后还需要 20 min 的染色体分离和细胞分裂。由此可见,真正完成一轮 DNA 复制实际需要 70 min。细菌细胞是如何来协调快速分裂和慢速的 DNA 复制之间的矛盾呢?原来,如图 11-11B 所示,在上一次细胞分裂结束时,细胞内的 DNA 已经复制到一半路程。细胞分裂后,立即开始新一轮的 DNA 复制。10 min 后,DNA 复制起始,复制的起点不是在一个 DNA 分子上,而是在两个正在形成中的 DNA 分子上同时开始。随着上次 DNA 复制的结束,染色体开始分裂,细胞也随之分裂。到两个细胞完全形成时,刚才开始的 DNA 复制又已经走过一半路程。前后时间持续 35 min。

新的细胞又开始下一轮的DNA复制准备。可以看出，在快速生长时，在一个细胞周期中每个DNA分子复制仅能完成一半，但DNA复制是在两个正在形成中的DNA分子上同时进行的。其结果是，经过70 min，两个DNA分子完成复制，得到4个DNA分子，细胞完成两轮细胞周期，得到4个细胞。

细菌在一定环境条件下，其慢速生长和快速生长可以相互转化。若慢速生长转化为快速生长，在第一次DNA复制起始之后立即开始新一轮的DNA复制起始，使两个DNA分子同时复制，细胞分裂后，形成两个各含DNA复制完成一半路程的子细胞。若快速生长转化为慢速生长，在细胞分裂之后仅开始新一轮的细胞周期，而不起始新的DNA复制，结果生成两个各含一个DNA分子的子细胞。

关于细菌细胞DNA复制起始调控和染色体分离及细胞分裂调控等方面的研究，已经获得了许多成果，目前仍在深入进行中。

二、有丝分裂

在这里，我们主要以高等动物细胞为例介绍有丝分裂。根据细胞形态结构的变化，传统上人们将有丝分裂过程人为地划分为前期、前中期、中期、后期、末期和胞质分裂等6个时期。前5个时期是一个先后相互连续的过程，胞质分裂则相对独立。胞质分裂开始于上述5个时期的一定阶段。

（一）有丝分裂过程

图11－12中的照片摄自经抗微管抗体和DNA染料双重染色的动物细胞。在细胞间期，细胞核结构清晰，微管以一个中心体为核心向四周辐射。随着细胞进入分裂期，细胞核结构和微管排列方式等，将发生一系列有序的变化。

1．前期

前期(prophase)是有丝分裂过程的开始阶段。前期开始时，细胞核染色质开始浓缩(condensation)，由原来漫长的弥漫样分布的线性染色质，经过进一步螺旋化，折叠和包装(packing)等过程，逐渐变短变粗，形成光镜下可辨的早期染色体结构。早期染色体的两条染色单体已经可以分辨。在每条染色单体上，都含有一段特殊的DNA序列，称为着丝粒DNA(centromere DNA)。其所在部位称为着丝粒(centromere)。两条染色单体的两个着丝粒对应排列。由于此处形态结构比较狭窄，被称为主缢痕(primary constriction)。前期的较晚时期，在着丝粒处逐渐装配另一种蛋白质复合体结构，称为动粒(kinetochore)。动粒和着丝粒紧密相连。随着染色质浓缩，中心体也开始发生剧烈变化。中心体是动物细胞内与微管装配和细胞分裂直接有关的一种细胞器。由于其常常位于间期细胞的中央，因而被命名为中心体。在细胞分裂前期，在中心体的周围，微管开始大量装配。微管是有极性的，朝向中心体的一端为负极，远离中心体的一端为正极。微管以中心体为核心向四周辐射，如同发出的光芒，因此，中心体与其周围的微管一起被称为星体(aster)。事实上，中心体在细胞间期也进行了复制。因

而，在细胞分裂前期，以中心体为核心而形成的星体实际上有两个。细胞分裂开始启动，两个星体即逐渐向细胞的两极运动。

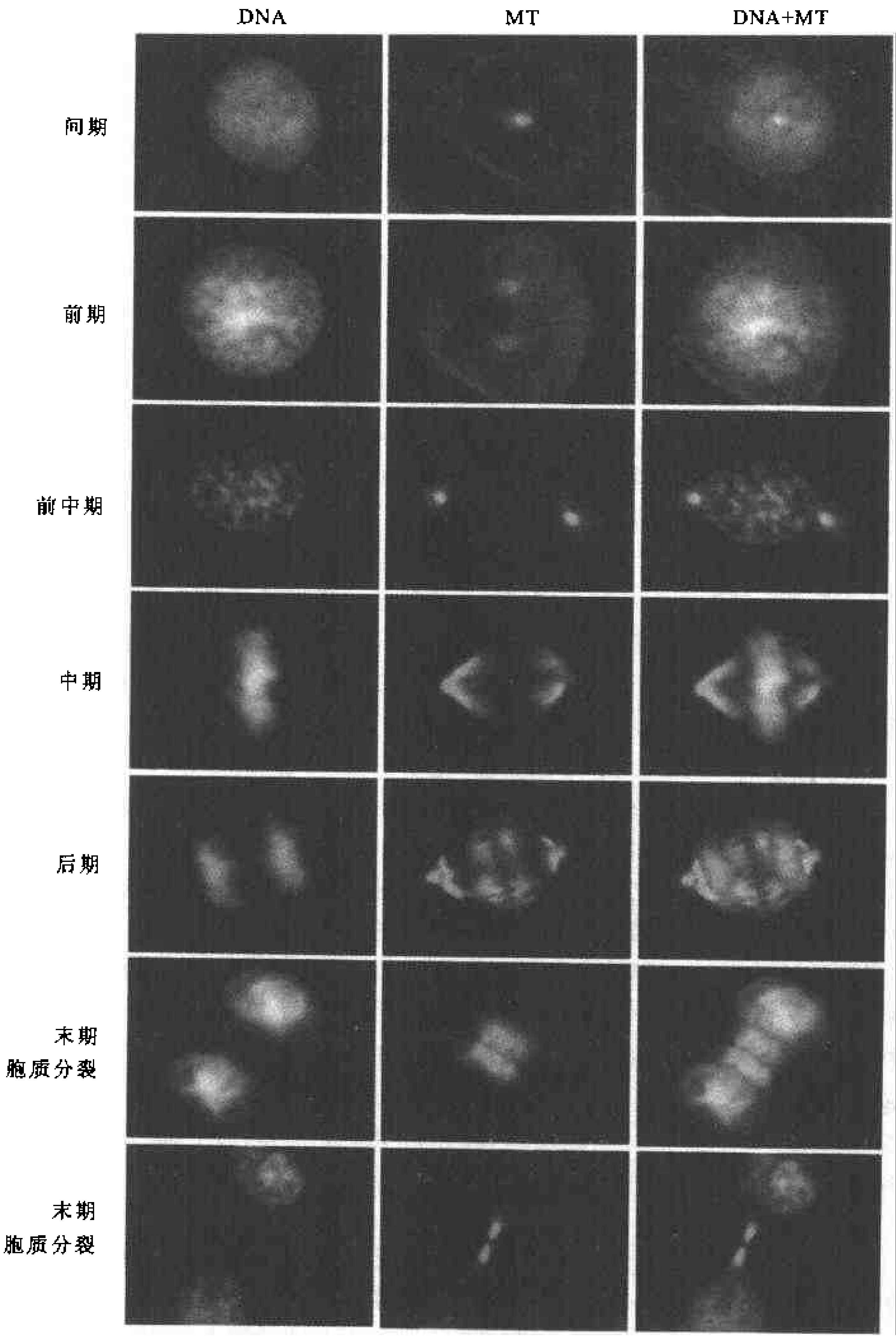


图 11－12　高等动物细胞有丝分裂过程

MT：表示微管（microtubule）

2. 前中期

核膜破裂，标志着前中期(prometaphase)的开始。核膜破裂后，以小膜泡的形式分散到细胞质中，在形态上与内质网膜泡难以区别。但在生化成分上是有一定区别的。由于核膜破裂，核质与细胞质之间的界膜消失而混合。核纤层也随之解聚成其组成成分核纤层蛋白。核骨架结构也发生剧烈变化，如组成核骨架结构的DNA拓扑酶Ⅱ，参与组成细胞分裂器的NuMA蛋白等，都将发生结构和位置变化，参与构成与间期细胞核骨架不同的结构成分。染色体将进一步凝集浓缩，变粗变短，形成明显的X形染色体结构。染色体在一定区域内剧烈运动。位于染色体着丝粒上的动粒逐渐成熟。从前期向中期转化过程中的另一个重要事件是纺锤体(spindle)的装配。纺锤体是一种与细胞分裂和染色体运动直接相关的一种临时性细胞器，主要由微管及其结合蛋白构成。在前期，两个星体的形成和向两极的运动，事实上标志着纺锤体装配的开始。随之，星体微管逐渐向"细胞核"内侵入。有的星体微管迅速捕获染色体，并与染色体一侧的动粒结合，形成动粒微管(kinetochore microtubule)。而由另一极星体发出的微管则迅速与染色体另一侧的动粒相联结。另一些星体微管的游离端也逐渐侵入核内，形成极性微管(polar microtubule)。动粒微管，极性微管以及辅助分子，共同组成前期纺锤体。此时的纺锤体赤道直径相对较大，两极直径的距离也相对较短。与同一条染色体的两个动粒相连接的两极动粒微管并不等长。因而染色体并不完全分布于赤道板，相互排列貌似杂乱无章。随后，在各种相关因素的共同作用下，纺锤体赤道直径逐渐收缩，两极距离拉长，染色体逐渐向赤道方向运动。细胞周期也由前中期逐渐向中期运转。

3. 中期

所有染色体排列到赤道板(equatorial plate)上，标志着细胞分裂已进入中期(metaphase)。纺锤体呈现典型的纺锤样。位于染色体两侧的动粒微管长度相等，作用力均衡。除动粒微管外，许多极性微管在赤道区域也相互搭桥，形成貌似连续微管结构。整个纺锤体微管数量，在不同物种之间变化很大，少则10多根，多的数千根甚至上万根。如真菌*Phycomyces*仅有10根纺锤体微管，产于澳洲的一种小袋鼠(rat kangaroo)，其纺锤体微管约有1 500根，而植物百合(*Haemanthus*)的纺锤体微管约有10 000根。染色体向赤道板上运动的过程称为染色体列队(chromosome alignment)或染色体中板聚合(congression)。染色体列队的运动速度非常之快，一般在每秒0.05～1 μm之间。染色体排列到赤道板上后，其两个动粒分别面向纺锤体的两极。在每一个动粒上结合的动粒微管可以多达几十根。

4. 后期

中期染色体的两条染色单体相互分离，形成子代染色体，并分别向两极运动，标志着后期(anaphase)的开始。后期大致可以划分为连续的两个阶段，即后期A和后期B。在后期A，动粒微管变短，染色体逐渐向两极运动；在后期B，极性微管长度增加，两极之间的距离逐渐拉长。整个后期阶段约持续数分钟。染色体运动的速度约每分钟1～2 μm。

染色体向两极的运动依靠纺锤体微管的作用。用破坏微管的药物如秋水酰胺、秋水仙素或 nocodazole 等处理，染色体的运动会立即停止。去除这些药物，染色体并不能立即恢复运动，而是要等到纺锤体重新装配后才能恢复。染色单体与纺锤体微管的联系也是染色单体运动所必需的。用实验方法破坏这种联系，染色单体运动停止，直到这种联系恢复，染色单体的运动才能恢复。

5．末期

染色单体到达两极，即进入了末期(telophase)。动粒微管消失，极性微管继续加长，较多地分布于两组染色单体之间。到达两极的染色单体开始去浓缩，在每一个染色单体的周围，核膜开始重新装配。首先是核膜前体小膜泡结合到染色单体表面，小膜泡相互融合，逐渐形成较大的双层核膜片段，然后再相互融合成完整的核膜，分别形成两个子代细胞核。在核膜形成的过程中，核孔复合体同时在核膜上装配。随着染色单体去浓缩，核仁也开始重新装配，RNA 合成功能逐渐恢复。

6．胞质分裂

胞质分裂(cytokinisis)开始于细胞分裂后期，完成于细胞分裂末期。胞质分裂开始时，在赤道板周围细胞表面下陷，形成环形缢缩，称为分裂沟(furrow)。随细胞由后期向末期转化，分裂沟逐渐加深，直至两个子代细胞完全分开。分裂沟的形成靠多种因素的相互作用。实验证明，肌动蛋白和肌球蛋白参与了分裂沟的形成和整个胞质分裂过程。在分裂沟的下方，除肌动蛋白之外，还有微管、小膜泡等物质聚集，共同构成一个环形致密层，称为中间体(midbody)。随胞质分裂，中间体将一直持续到两个子细胞完全分离。胞质分裂开始时，大量的肌动蛋白和肌球蛋白在中间体处装配成微丝并相互组成微丝束，环绕细胞，称为收缩环(contractile ring)。收缩环收缩，分裂沟逐渐加深，细胞形状也由原来的圆形逐渐变为椭圆形、哑铃形，直到两个子细胞相互分离。用抗肌动蛋白和抗肌球蛋白的抗体作免疫荧光染色，可见随分裂沟的形成，其下面的荧光亮度逐渐增强，并明显高于其他部位。在电镜下，可见大量的微丝结构分布于分裂沟下。用抗肌动蛋白、抗肌球蛋白或特异破坏微丝的药物如细胞松弛素 B 处理处于分裂期的活细胞，收缩环的收缩活动停止，分裂沟逐渐消失。胞质分裂整个过程可以简单地归纳为 4 个步骤，即分裂沟位置的确立、肌动蛋白聚集和收缩环形成、收缩环收缩、收缩环处细胞膜融合并形成两个子细胞(图 11－13)。

分裂沟的定位与纺锤体的位置明显相关。人为地改变纺锤体的位置可以使分裂沟的位置改变。对分裂沟定位的分子作用机制目前尚不清楚，但 R.Papport 等人的系列实验亦显示，极性微管参与了分裂沟的形成。在末期开始时，星体微管加长直到与细胞膜下的皮层接触。在分裂沟即将形成的地方，从两极发出的星体微管的末端相互重合。微管末端对细胞皮层刺激，促使分裂沟形成(图 11－14)。目前，对肌动蛋白聚集和收缩环的形成也不完全了解。对于收缩环收缩和收缩环处细胞膜融合两个步骤的研究，近年来有了较大进展。Larochelle 等人于 1996—1997 年在 *Dictyostelium* 中发现，*ras* 基因家族中的

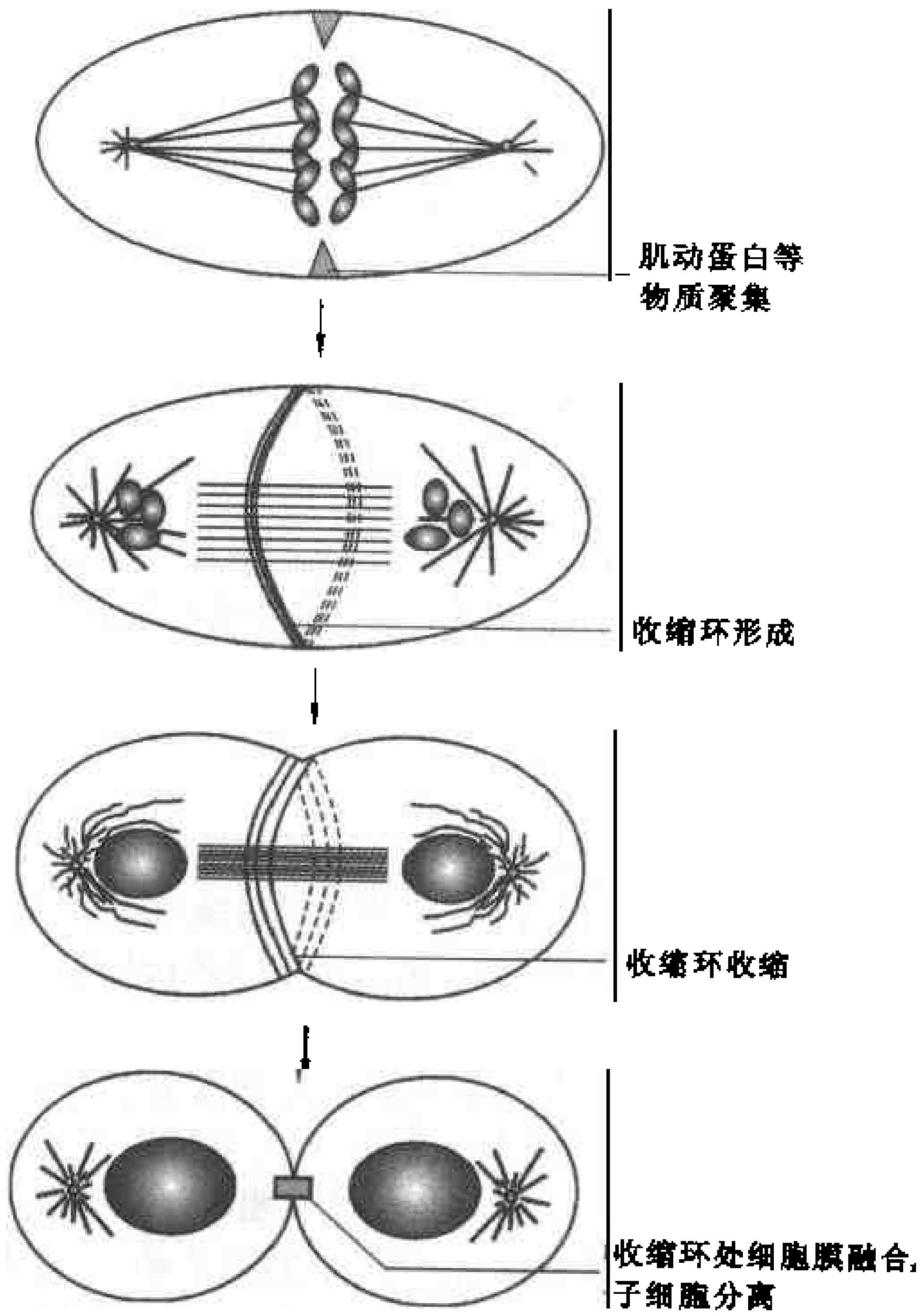


图 11－13　胞质分裂过程

racE 基因在收缩环收缩和细胞膜融合过程中起重要作用。*racE* 基因产物是一个小分子的 GTP 酶。另外两组科学家则发现,两种参与调节小分子 GTP 酶活性的蛋白 GapA 和 RgaA/DPAP1 也参与收缩环收缩和细胞膜融合过程。

也有实验证明,钙离子浓度的变化也会影响分裂沟的形成。将荧光标记的钙离子指示剂注射细胞,发现在分裂沟下钙离子浓度上升。将钙离子直接注射到蛙卵细胞膜下,可以刺激分裂沟形成。

(二) 与有丝分裂直接相关的亚细胞结构

1. 中心体

中心体(centrosome)是一种与微管装配和细胞分裂密切相关的细胞器。每个处于静止期的高等动物间期细胞通常含有一个中心体。中心体一般由一对位于中央的中心粒和其周围的无定型物质构成。两个中心粒相互成直角排列。每一个中心粒为一个圆筒状结构,直径约 0.25 μm,长度不定。圆筒的壁由 9 组三联微管构成。三联微管的主要成分为 α、β 微管蛋白。圆筒内也含有一些特殊

结构，但目前尚不完全清楚。中心粒圆筒周围为中心粒外基质（pericentriolar matrix）。其组成成分并不完全清楚，目前已知的成分主要有 γ 微管蛋白，pericentrin 等。

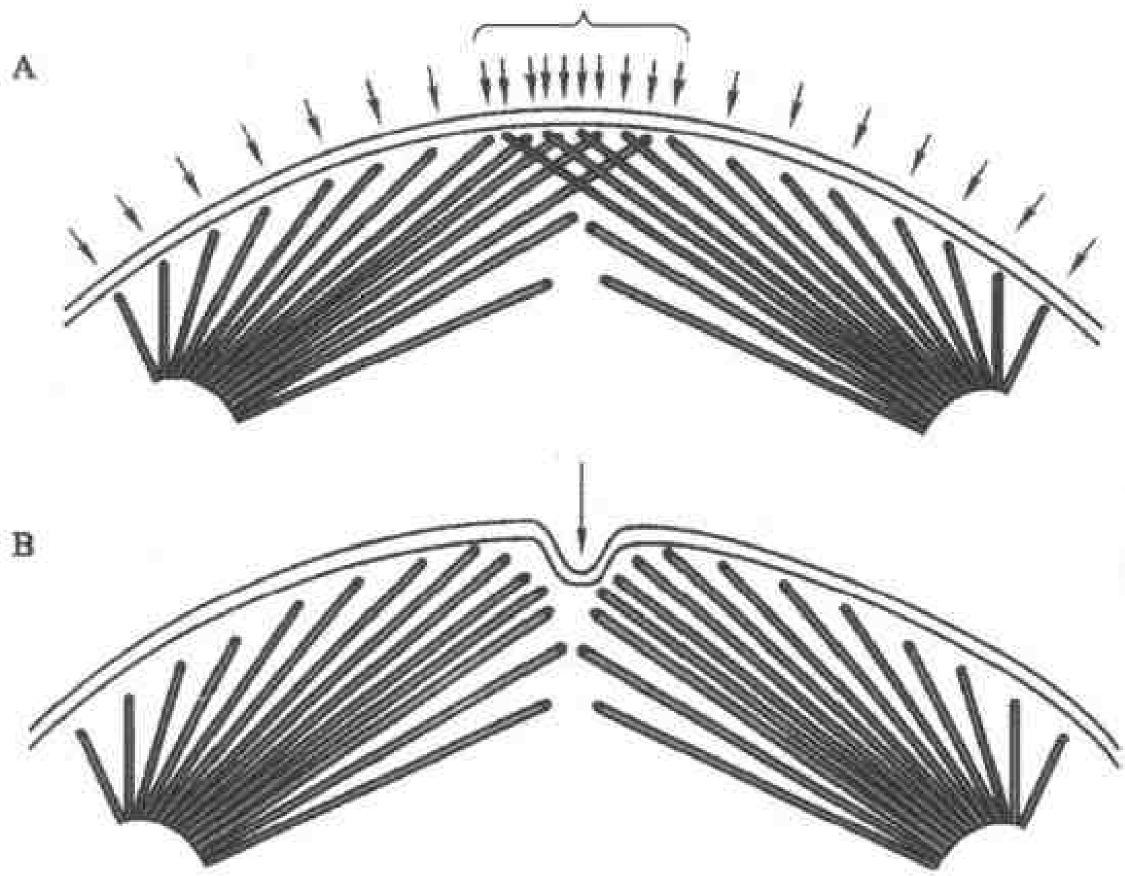


图 11－14 星体微管刺激分裂沟形成

A：分裂后期，星体微管加长并于细胞膜下的皮层接触，在未来分裂沟形成处的细胞膜下，来自两极的微管相互重合；B：微管末端刺激皮层，促使分裂沟形成（引自 S.L. Wolfe）

在间期细胞中，微管围绕中心体装配，如同星光向四周辐射。因而，中心体与四射的微管合称为星体。当细胞走向分裂时，星体参与装配纺锤体。

中心体在细胞周期过程中也要进行复制，并经历一系列的发育过程，称为中心体（或中心粒）周期（centrosome cycle，centriole cycle）（图 11－15）。中心体在 G_1 期末开始复制。到达 S 期，细胞已经含有一对中心体，但两者并不分开。到达 G_2 期，一对中心体开始分离，并各自向细胞的两极移动，并参与装配纺锤体。到细胞分裂结束，两个子细胞分离，每个子细胞获得一个中心体。

2．动粒与着丝粒

动粒（kinetochore）又称为着丝点，是附着于着丝粒上的一种细胞器，而着丝粒则是指染色体主缢痕部位的染色质。动粒的外侧主要用于纺锤体微管附着，内侧与着丝粒相互交织。每条中期染色体上含有两个动粒，分别位于着丝粒的两侧。细胞分裂后，两个动粒分别被分配到两个子细胞中。当细胞再次进入 S 期后，动粒又会重新复制。用抗动粒蛋白的抗体作免疫荧光染色，可以清楚地识别动粒所在位置。在电镜下，动粒为一个圆盘状结构，分内、中、外三层。内层宽约 40～60 nm，可能由着丝粒染色质构成；外层宽约 40～60 nm，为细纤维网络样结构；中层宽约 25～30 nm，有细纤维横跨内外层之间。在外层的表面，为一

些纤维样物质(图 11－16,图 11－17)。由于动粒和着丝粒联系紧密,结构成分相互穿插,在功能方面联系密切,因而两者常被一些人合称为着丝粒－动粒复合体(centromere－kinetochore complex)。

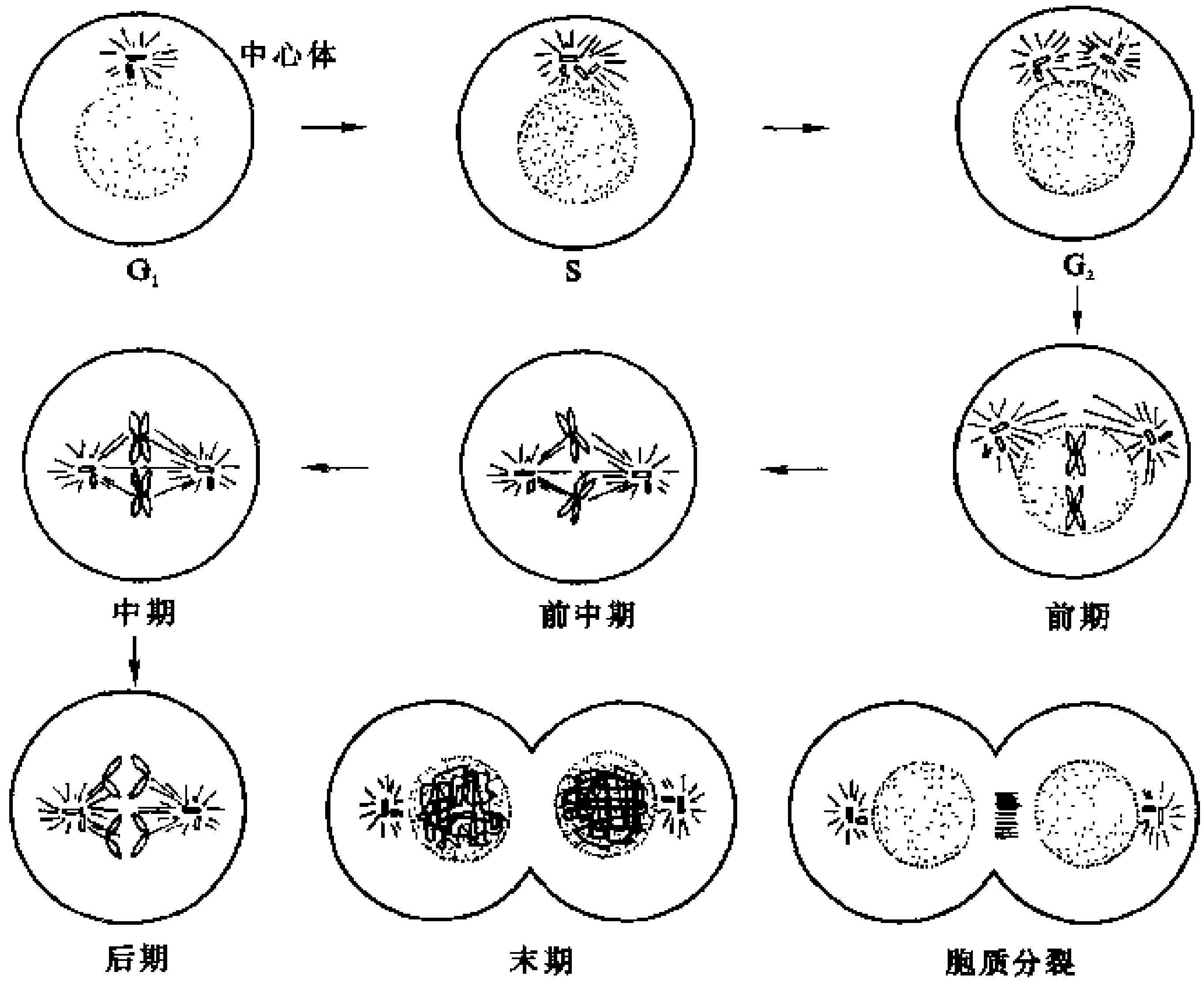


图 11－15　中心体循环

中心体在 G_1 期末复制;在 S 期,复制后的一对中心体仍联结在一起;到 G_2 期,一对中心体开始分离并逐渐向细胞两极移动;细胞分裂结束,子细胞分离,各获得一个中心体

动粒的分子结构尚不清楚。但目前已经分离了几种动粒蛋白质成分,如哺乳类的 CENP－A,CENP－B,CENP－C,CENP－E,CENP－F,INCENP 等。CENP－A 的相对分子质量约为 17×10^3,是一种组蛋白 H3 类的蛋白质,与组蛋白 H3 在 C 端有 62%的同源序列。免疫标记技术证实 CENP－A 定位于动粒的内层。CENP－B 的相对分子质量约 80×10^3,主要定位于动粒内层内侧的着丝粒上。CENP－C 的相对分子质量约为 140×10^3,定位于动粒的内层。CENP－E 的相对分子质量约 312×10^3,是一种驱动蛋白(kinesin),定位于动粒外层表面的冠上。CENP－E 被认为在促使染色体与来自两极的微管相联结过程中起重要作用。CENP－E 在前中期与微管结合,以后逐渐转移到动粒上。到分裂后期,CENP－E 离开动粒,转移到纺锤体的中间区。CENP－F 的相对分子质量约为 330×10^3,在间期,CENP－F 是一种核骨架蛋白;在分裂前期,转移到动粒上;到分裂后期,再转移到纺锤体的中间区域;到末期,再度转移到中体上。在酵母细胞中也已分离到了在结构和功能上与此类同的蛋白质。

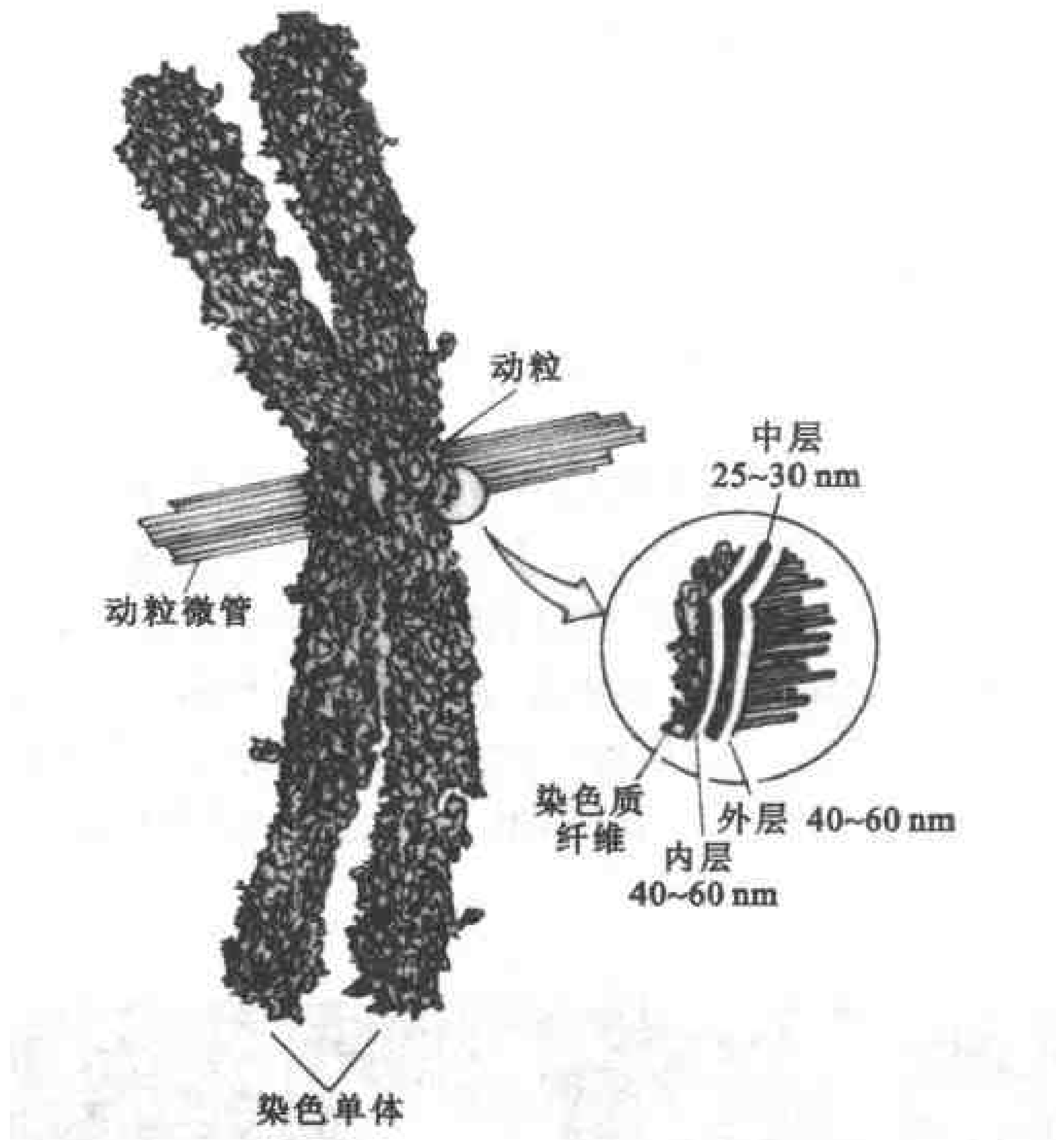


图 11－16　动粒结构模式图

动粒从内到外可分为三层结构，即内层、中层和外层。内层直接与着丝粒联结，外层直接与动粒微管联结

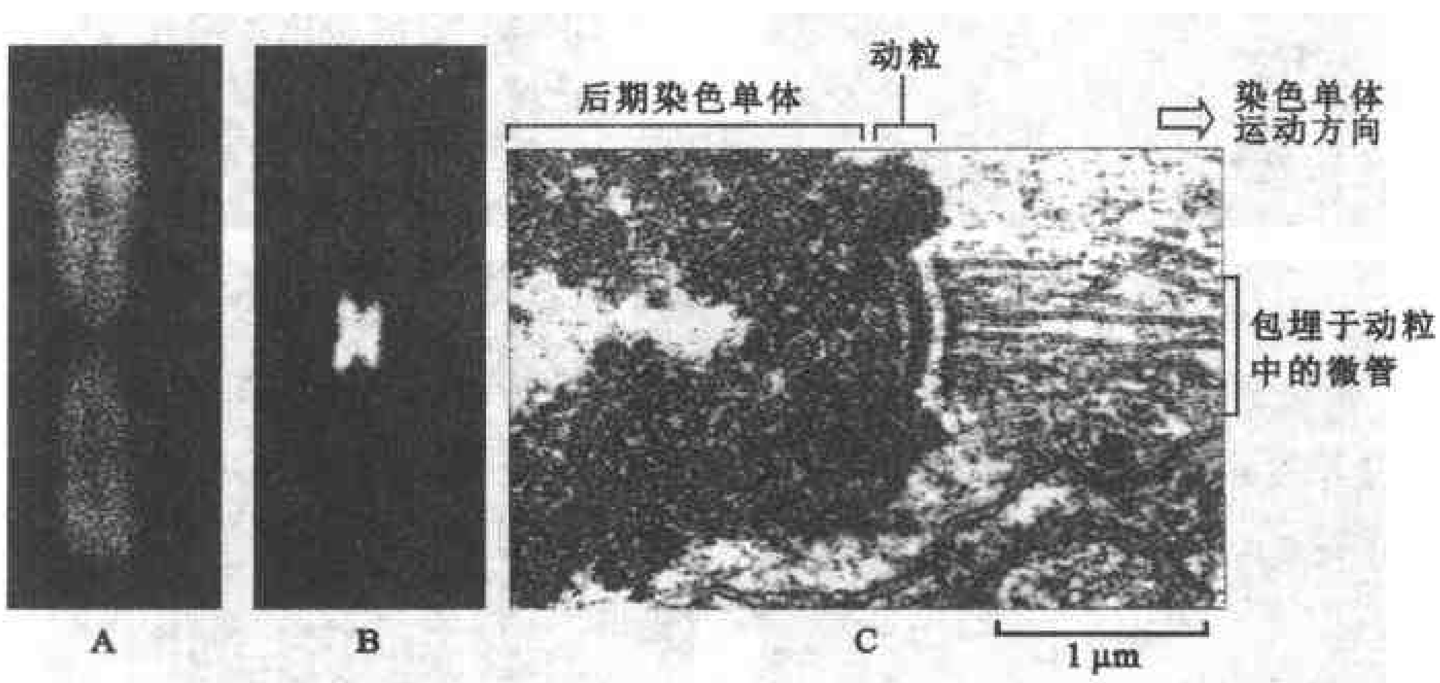


图 11－17　应用免疫荧光技术和电镜技术显示动粒位置和结构

A：DNA 荧光染料染色显示一条中期染色体；B：应用抗动粒蛋白的抗体进行免疫荧光染色，显示两个动粒所在部位；C：透射电镜技术显示一条染色单体上的动粒结构

着丝粒 DNA 主要由 α 卫星 DNA 构成。着丝粒 DNA 片段大小由芽殖酵母的一百多碱基对、裂殖酵母的 100 kb(千碱基对)到人类的几千个千碱基对不等。大的着丝粒 DNA 片段则主要由一些特殊序列重复排列构成。着丝粒 DNA 也

伸入到动粒的内层，成为动粒内层的组成成分。至于着丝粒染色质是如何装配的，着丝粒形成后又是如何引导动粒在其附近装配的，至今并不十分清楚。

动粒在细胞分裂过程中的重要性一直受到科学家的高度重视。染色体依靠动粒捕捉由纺锤体极体发出的微管。没有动粒的染色体不能与纺锤体微管发生有机联系，也不能和其他染色体一起向两极运动。用药物 caffeine 处理细胞，可以使动粒与染色体脱离，等到分裂期，动粒则单独向两极移动。

3．纺锤体

纺锤体(spindle)是细胞分裂过程中的一种与染色体分离直接相关的细胞器。高等细胞的纺锤体呈纺锤状，主要由微管和微管结合蛋白组成。纺锤体的两端为星体。如前所述，组成纺锤体的微管可以分为两种类型，即动粒微管和极性微管。动粒微管的一端与中心体相连，另一端与动粒相连。极性微管的一端与中心体相连，而另一端游离。从两极发出的极性微管常在赤道处相互搭桥(图 11－18)。植物细胞不含中心体，但其纺锤体仍能够像动物细胞一样，维持纺锤样结构。

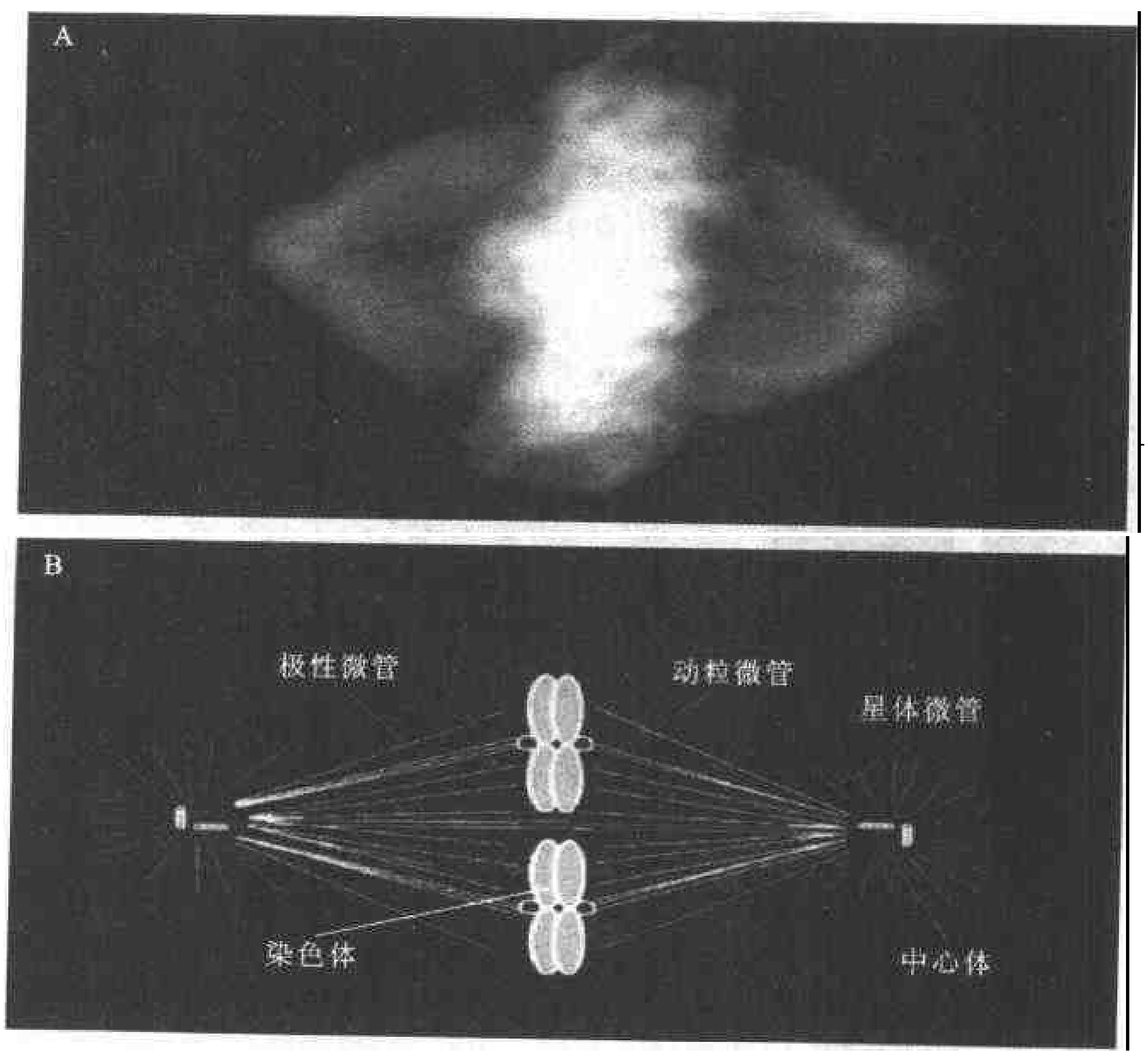


图 11－18　高等动物细胞纺锤体结构

A：DNA 染料 DAPI 染色和抗微管抗体免疫荧光染色分别显示染色体和纺锤体结构

B：染色体和纺锤体结构模式图

纺锤体装配是一个十分复杂的细胞代谢过程。首先要涉及到微管在中心体周围装配和已经完成复制的中心体的分离。微管在中心体周围装配需要许多调节因素的参与。已知中心体周围物质的一些成分如 γ 微管蛋白，pericentrin 等参与了中心体周围微管的装配。中心体的分离需要移动素类蛋白(kinesin－related proteins，KRPs)和细胞质动力蛋白(dynein)等的作用(图 11－19)。KRPs 主要为一些向微管正极运动(正向运动)的蛋白，而细胞质动力蛋白主要为向微

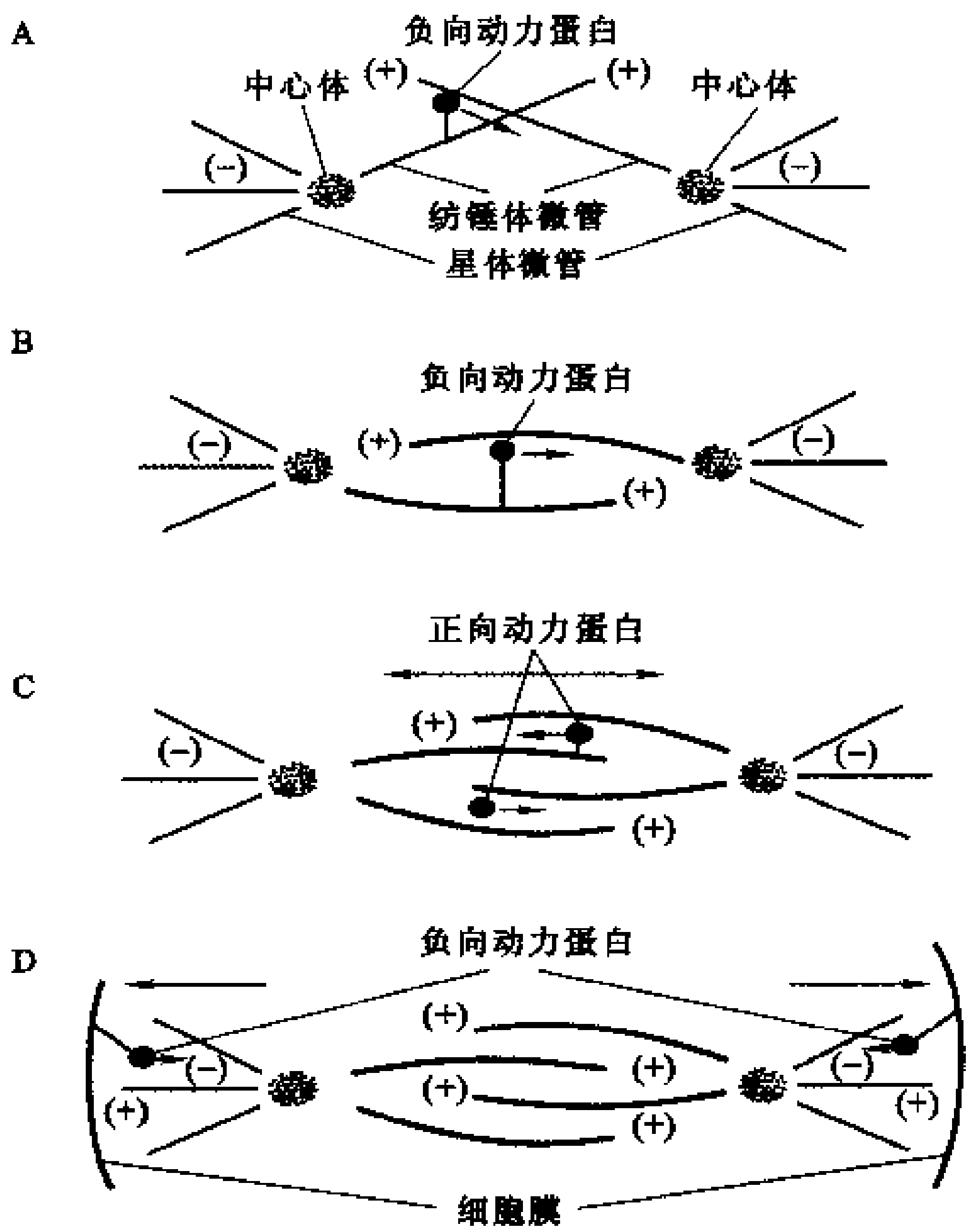


图 11－19　纺锤体装配过程

A：中心体分离，负向运动动力蛋白与来自姐妹中心体的纺锤体微管结合；B：借助动力蛋白向微管负极运动，将纺锤体微管牵拉在一起，形成早期纺锤体；C：正向运动动力蛋白在纺锤体微管之间搭桥，借助正向运动，将纺锤体拉长；D：负向运动的动力蛋白在细胞膜和星体微管之间搭桥，借助负向运动，将中心体进一步拉近两极的细胞膜，纺锤体进一步被拉长

管负极运动(负向运动)的蛋白。中心体分离时，负向运动的动力蛋白在来自姐妹中心体的微管之间搭桥，通过向负极运动，将被结合的微管牵拉在一起，组成纺锤体微管；中心体也自然形成了纺锤体的两极。这一过程称为中心体列队(centrosome alignment)(图 11－19A，B)。然后，正向运动的动力蛋白在纺锤体微管之间搭桥，借助向微管正极运动，将纺锤体拉长，中心体之间的距离逐渐加

大(图 11-19C)。当纺锤体拉长到一定程度后,负向运动的动力蛋白在细胞膜和星体微管之间搭桥,借助负向运动,将星体拉近两极的细胞膜,纺锤体也进一步被拉长(图 11-19D)。

(三)有丝分裂过程中染色体运动的动力机制

1. 染色体列队

染色体列队是有丝分裂过程中的重要事件之一,是启动染色体分离并向两个子细胞中平均分配的先决条件。染色体队列不整齐,细胞不能从分裂中期向后期转化,两条染色单体不能相互分离;个别情况下,细胞分裂虽然可以继续进行,但常常导致染色体不能平均分配,最终导致细胞死亡。染色体是如何列队呢?这一问题长期以来一直困扰着有关生物学家。直到最近,这一研究领域才终于取得了突破性进展。近期的研究发现,至少有数种蛋白质与染色体列队直接相关,其中首要的两组蛋白质称为 Mad 蛋白和 Bub 蛋白。Mad 和 Bub 可以使动粒敏化,促使微管与动粒接触。免疫荧光染色发现,Mad2 和 Bub1 位于前期和前中期染色体的动粒上。如果染色体被纺锤体微管捕获,Mad2 和 Bub1 很快会从动粒上消失。一侧的动粒被微管捕捉,一侧的 Mad2 和 Bub1 消失;两侧的动粒被微管捕捉,两侧的 Mad2 和 Bub1 消失。如果染色体不被微管捕捉,则 Mad2 和 Bub1 不从动粒上消失。因而认为 Mad2 和 Bub1 与染色体装配入纺锤体有关。进一步研究发现,由于某些染色体不能被微管及时捕捉而滞后,Mad2 和 Bub1 不能从这些染色体的动粒上消失,后期则不能启动,染色单体不能相互分离。只有等到这些染色体也被微管捕捉并排列到赤道板上,Mad2 和 Bub1 从动粒上消失,后期才能开始启动(图 11-20)。

当染色体上的两个动粒被微管捕捉后,细胞通过什么机制将染色体排列到赤道板上呢?解释这一问题,目前流行两种学说,即牵拉(pull)假说和外推(push)假说(图 11-21)。牵拉假说认为,染色体向赤道板方向运动,是由于动粒微管牵拉的结果。动粒微管越长,拉力越大,当来自两极的动粒微管的拉力相等时,染色体即被稳定在赤道板上(图 11-21A);外推假说认为,染色体向赤道方向移动,是由于星体的排斥力将染色体外推的结果。染色体距离中心体越近,星体对染色体的外推力越强,当来自两极的推力达到平衡时,染色体即被稳定在赤道板上(图 11-21B)。这两种假说并不相互排斥,有时可能同时作用,或有其他机制共同参与,最终将染色体排列在赤道板上。

在所有染色体排列到赤道板上之前,为什么后期不能启动呢?有人认为,动粒在与微管联结之前,会发出抑制信号,抑制细胞周期向下一个阶段运转。另一些科学家为了验证这一观点,用激光特异地破坏滞后染色体的尚未与微管联结的动粒,发现尽管染色体依然滞后,细胞周期却可以随之向下一阶段转化,提示未与微管联结的动粒确实可以发出抑制信号,抑制细胞周期向下一阶段运转。更为直接的证据显示,Mad2 可以与后期促进因子复合体(anaphase-promoting complex,APC)及其他相关物质结合,抑制 APC 的活性,阻止细胞周期向下一个阶段发展。

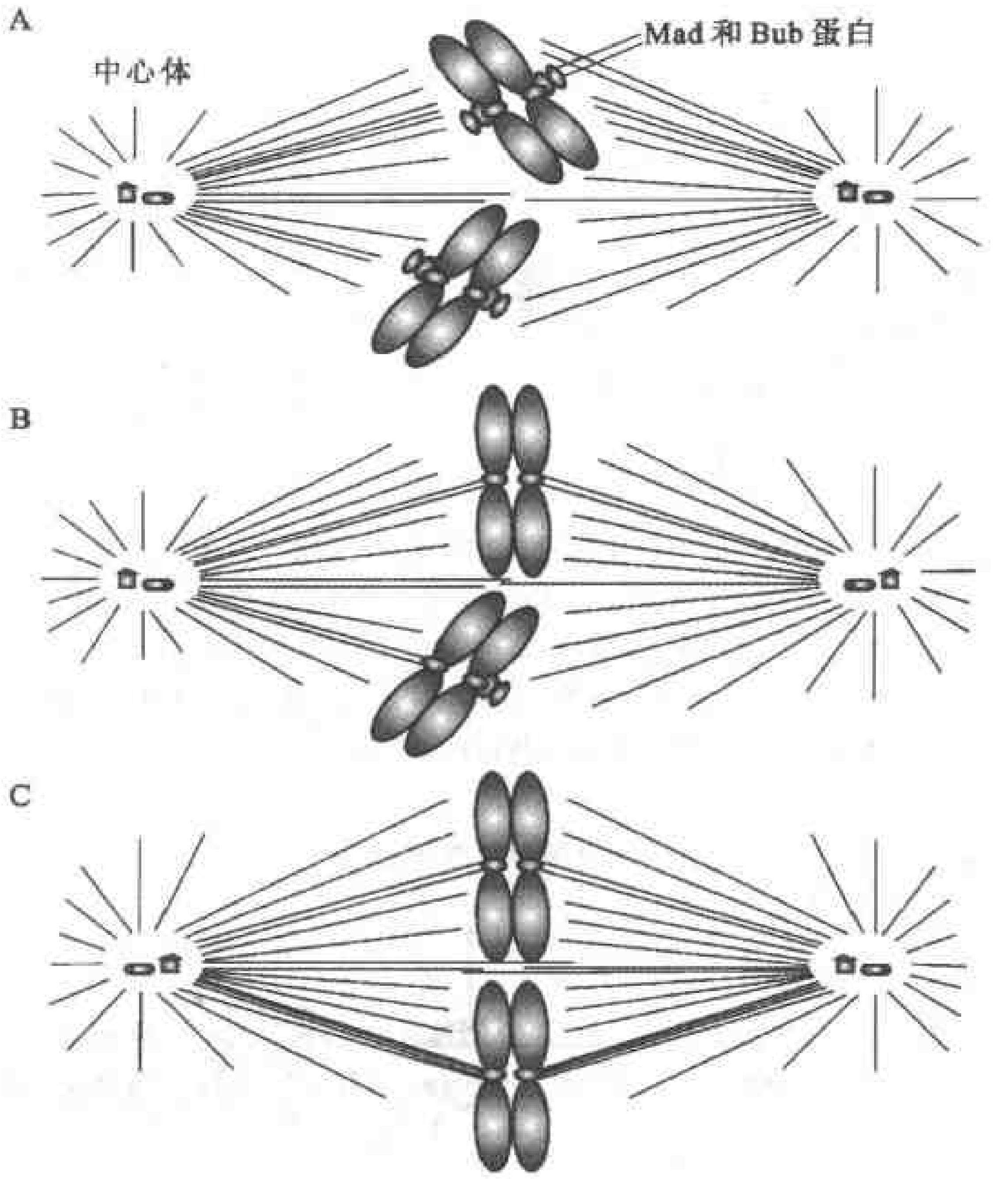


图 11－20 染色体列队

A：细胞分裂前期和前中期，Mad 和 Bub 蛋白在染色体的动粒上聚集；B：微管与动粒联结后，Mad 和 Bub 蛋白消失；某些染色体滞后，未与微管联结的动粒依然含有 Mad 和 Bub 蛋白；C：所有染色体的动粒均与微管联结，Mad 和 Bub 蛋白消失，染色体列队到赤道板

微管与动粒联结后，抑制后期启动的信号又是如何解除的呢？有人认为 CENP－E 和 Bub 蛋白在这一过程中起了重要作用。当微管与动粒联结后，CENP－E 分子的结构和位置将发生变化，这些变化进一步影响到 Bub1 的活性。Bub1 活性变化，又进一步影响到 Mad2 的稳定性和与其他有关物质的结合，最终导致 Mad2 对 APC 抑制的解除。

2．染色体分离

当染色体排列到赤道板上后，在各种调节因素的共同作用下，细胞周期由中期向后期转化，同源染色单体分离并逐渐向两极移动。解释后期染色单体分离和向两极移动的运动机制，曾有多种假说。目前比较广泛支持的假说是后期 A 和后期 B 两个阶段假说。在后期 A，动粒微管变短，将染色体逐渐拉向两极。一般认为，动粒微管变短是由于其动粒端解聚所造成的；而这种解聚又是由于动力蛋白沿动粒微管向极部运动的结果。如图 11－22 所示，微管动力蛋白首先结合

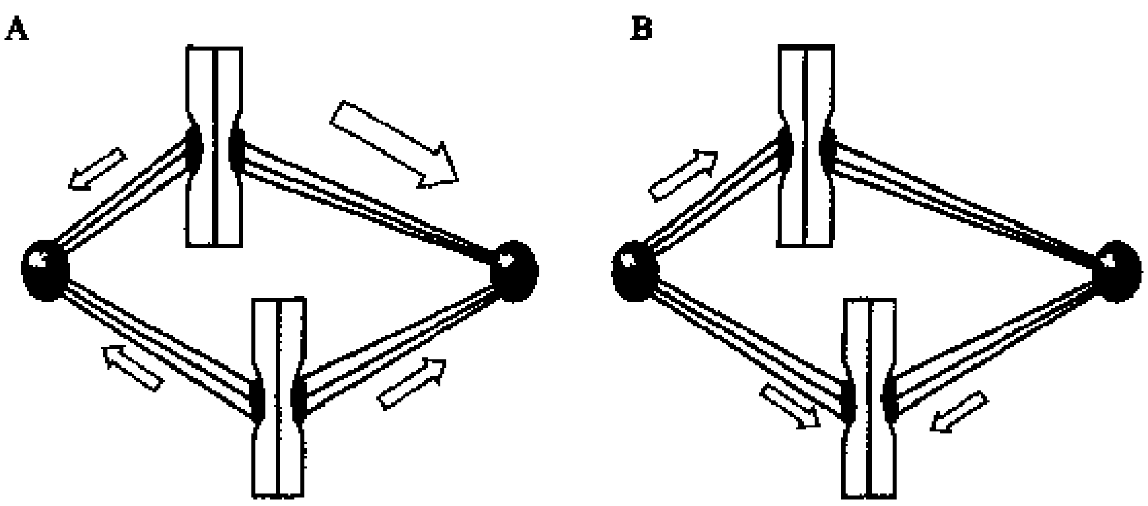


图 11-21 解释染色体向赤道板排列的两种假说

A：牵拉(pull)假说：认为染色体运动是由于动粒微管的牵拉作用；当染色体两侧动粒微管的作用力达到平衡时，染色体即被排列到赤道板上；B：外推(push)学说：认为染色体向赤道方向移动是由于星体的排斥作用，将染色体外推；当染色体两侧的外推力达到平衡时，染色体即被排列到赤道板上

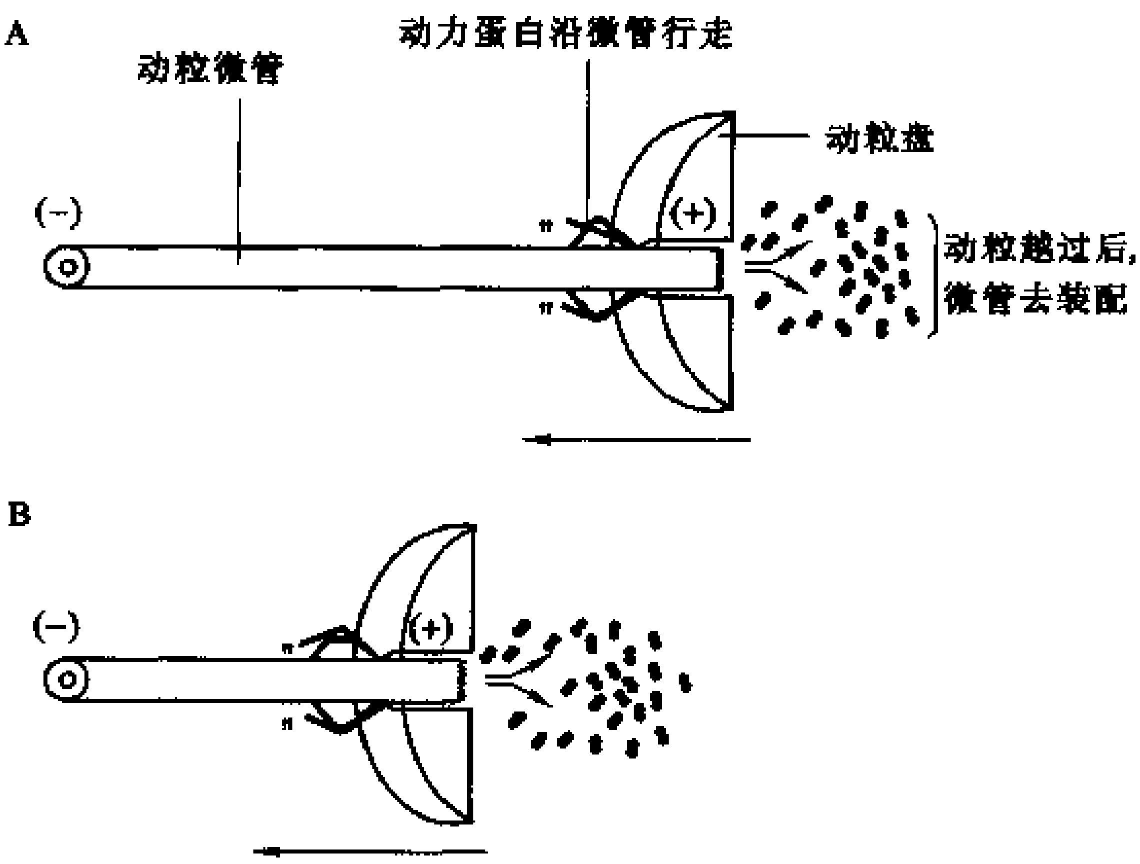


图 11-22 细胞分裂后期 A 动粒沿动粒微管向极部运动

后期开始时，动力蛋白沿动粒微管向微管负极行走，引导动粒向极部运动；当动粒越过后，动粒微管的正极末端随之去装配

到动粒上，在 ATP 分解提供能量的情况下，沿动粒微管向极部运动，并带动动粒和染色单体向极部运动。动粒微管的末端随之降解成微管蛋白二聚体，动粒微管变短，动粒和染色单体与两极之间的距离逐渐拉近。当染色单体接近两极，后期 A 结束，转向后期 B。在后期 B，极性微管游离端（正极）在 ATP 提供能量的情况下微管蛋白聚合，使极性微管加长，形成较宽的极性微管重叠区。KRPs 与极性微管重叠区的微管结合并在来自两极的极性微管之间搭桥。KRPs 向微管正极行走，促使来自两极的极性微管在重叠区相互滑动，使重叠区逐渐变得狭

窄,两极之间的距离逐渐变长。同时,胞质动力蛋白在星体微管和细胞膜之间搭桥,并向星体微管负极运动,进一步将两极之间的距离拉长(图 11－23)。

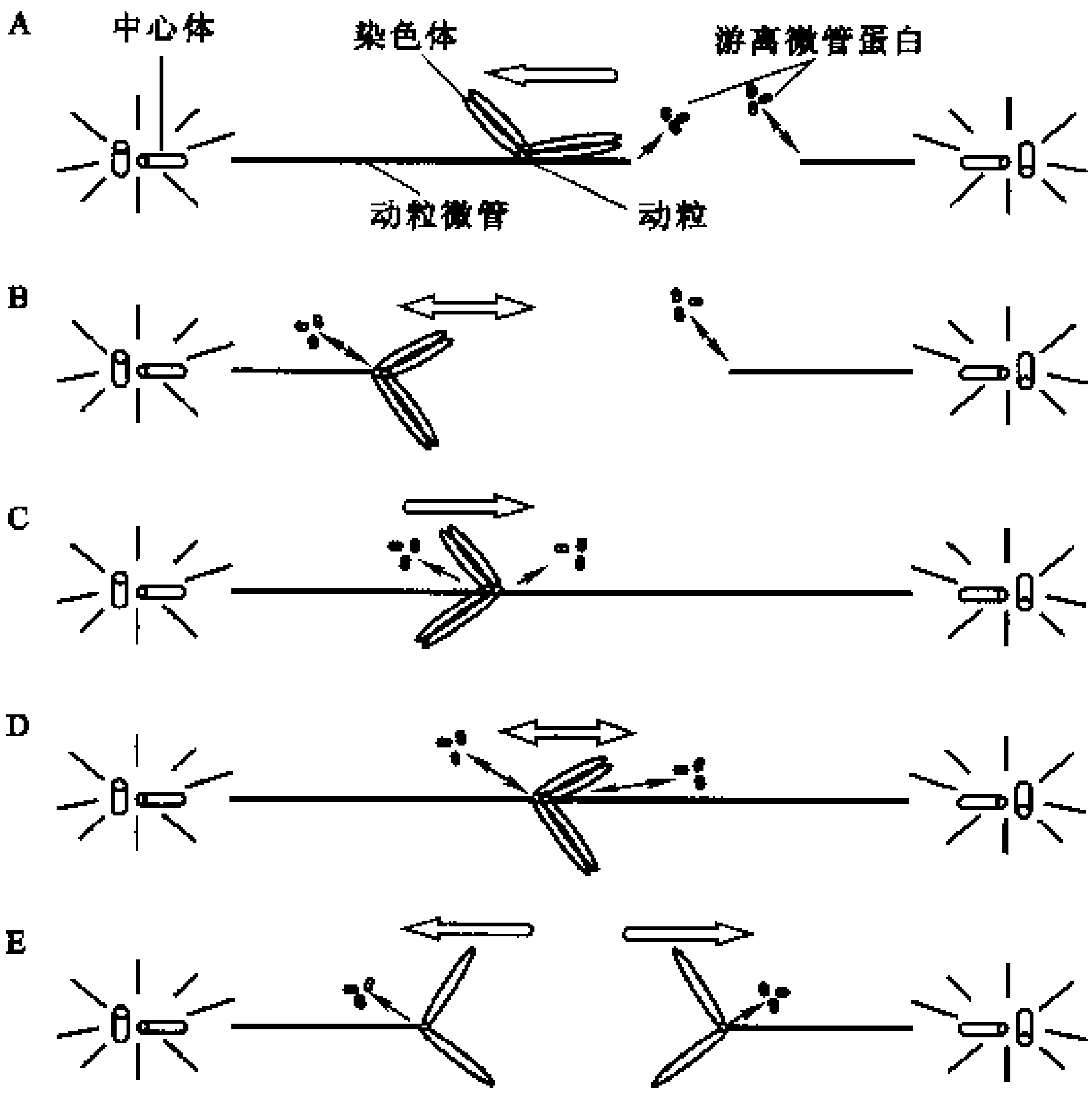


图 11－23　细胞分裂后期 B 纺锤体拉长

三、减数分裂

减数分裂是一种特殊的有丝分裂形式,仅发生于有性生殖细胞形成过程中的某个阶段。减数分裂的主要特点是,细胞仅进行一次 DNA 复制,随后进行两次分裂。两次分裂分别称为减数分裂期Ⅰ和减数分裂期Ⅱ。在两次分裂之间,还有一个短暂的分裂间期。两性生殖细胞经过减数分裂,各自的染色体数减少一半。再经过受精,形成合子,染色体数恢复到体细胞的染色体数目。减数分裂的意义在于,既有效地获得父母双方的遗传物质,保持后代的遗传性,又可以增加更多的变异机会,确保生物的多样性,增强生物适应环境变化的能力。相反,假如在有性生殖过程中没有减数分裂,生殖细胞染色体数不能减半,经过受精,其染色体数必将倍增。细胞体积也会相应增加,生物个体体积也会增长。代代相传,其生命活动将无法适应环境变化,终将受到自然淘汰。因而,减数分裂是生物有性生殖的基础,是生物遗传、生物进化和生物多样性的重要基础保证。

与有丝分裂相似,在减数分裂之前的间期阶段,也可以人为地划分为 G_1

期、S 期、G_2 期等三个时期。但此间期阶段也有其鲜明的特殊性。为区别于一般的细胞间期，常把减数分裂前的细胞间期称为减数分裂前间期（premeiotic interphase）。

（一）减数分裂前间期

减数分裂前间期的最大特点在于其 S 期持续时间较长，同时也发生一系列与减数分裂相关的特殊事件。例如，蝾螈（*Triturus*）体细胞有丝分裂前 S 期约为 12 h，而减数分裂前 S 期则可持续 10 天。小鼠有丝分裂前 S 期约为 5～6 h，而其减数分裂前 S 期约为 14 h（见表 11－1 所示）。另一个重要特点是，在植物百合中发现，其减数分裂前间期的 S 期仅复制其 DNA 总量的 99.7%～99.9%，而剩下的 0.1%～0.3% 要等到减数分裂前期阶段才进行复制。科学家发现，这些推迟复制的 DNA 被分割为 5 000～10 000 个小片段，分布于整个基因组中，每个小片段长约 1 000～5 000 bp。另外还发现，有一种蛋白质，称为 L 蛋白，在减数分裂前间期与上述 DNA 小片段结合，阻止其复制。这些 DNA 小片段被认为与减数分裂前期染色体配对和基因重组有关。

表 11－1　减数分裂前 S 期与有丝分裂前 S 期持续时间比较*

物　种	减数分裂前 S 期	有丝分裂前 S 期
蝾螈	10 天	12 h
小鼠	14 h	5～6 h
小麦（*Trticum*）	12 h	3.8 h
酵母（*Saccharomyces*）	1.0 h	0.5 h

* 引自 S.L. Wolfe

大多数生物，其减数分裂前间期的细胞核大于其体细胞核。染色质也多凝集成异染色质。这种变化的意义虽不明了，但一般认为与染色体配对和基因重组有关。另外，根据生物种类不同，减数分裂前间期的 G_2 期的长短变化较大。有的 G_2 期短，有的则和有丝分裂前间期的 G_2 期长短相当，也有的可以在 G_2 期停滞较长一段时间，直到受到新的刺激来打破这种停滞。

（二）减数分裂过程

减数分裂前 G_2 期细胞进入两次有序的细胞分裂，即第一次减数分裂和第二次减数分裂。两次减数分裂之间的间期或长或短，但无 DNA 合成。减数分裂过程见图 11－24。

1. 减数分裂期 Ⅰ

减数分裂期Ⅰ（meiosis Ⅰ）与体细胞有丝分裂期，有许多相似之处。其过程也可以人为地划分为前期Ⅰ，前中期Ⅰ，中期Ⅰ，后期Ⅰ，末期Ⅰ和胞质分裂Ⅰ等 6 个阶段。但减数分裂期Ⅰ又有其鲜明的特点。其主要表现在分裂前期的染色体配对和基因重组以及其后的染色体分离方式等方面。

（1）前期Ⅰ

前期Ⅰ（prophase Ⅰ）持续时间较长。在高等生物，其时间可持续数周、数月、数年，甚至数十年。在低等生物，其时间虽相对较短，但也比有丝分裂前期持

续的时间长得多。在这漫长的时间过程中，要进行染色体配对和基因重组。此外，也要合成一定量的 RNA 和蛋白质。根据细胞形态变化，又可以将前期Ⅰ人为地划分为细线期、偶线期、粗线期、双线期、终变期等 5 个阶段。

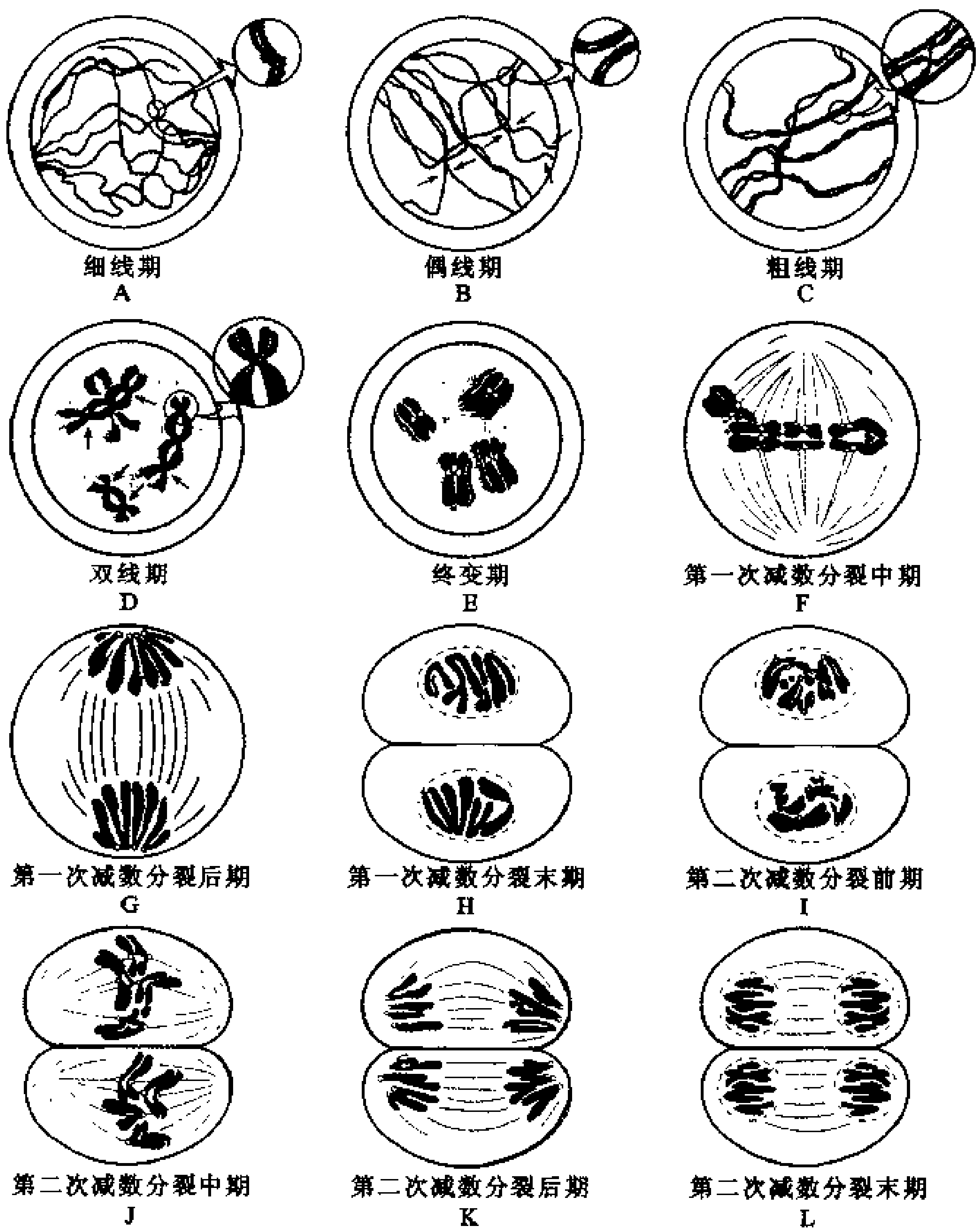


图 11-24 减数分裂过程图解

细线期、偶线期和粗线期阶段两个染色单体之间的裂隙在普通光学显微镜下实际看不到；引出的圆圈为局部放大；箭头所指处为配对在发展；双线期可见四分体(引自 S.L.Wolfe)

细线期(leptotene，leptonema)：为前期Ⅰ的开始阶段。首先发生染色质凝集，染色质纤维逐渐折叠，螺旋化，变短变粗，包装成在显微镜下可以看到的细纤维样染色体结构。因而，有人将细线期也称为凝集期(condensation stage)。细线期与有丝分裂前期起始阶段也有着明显的不同。首先，在细线期染色质虽然

发生凝集，但两条染色单体的臂并不分离，在显微镜下看不到双线样染色体结构，而是呈细的单线状。有人认为，将两条染色单体紧密联系在一起的一种因素可能是在减数分裂前S期未被复制的DNA片段。如图11－25所示，由于DNA复制尚未完成，两条染色单体不能完全形成，因而，染色单体的臂也就不能分离。另一个明显不同点是，在细纤维样染色体上，出现一系列大小不同的颗粒状结构，称为染色粒(chromomere)。虽然已经知道染色粒由染色质组成，但其功能并不清楚。细线期还有一个明显的特点，即染色体端粒(telomere)通过接触斑与核膜相连。而染色体的其他部分以袢状伸延到核质中。有的物种，接触斑位于细胞核的一侧，染色体呈花束状向核内其他部位伸延。因而，有人也将细线期称为花束期。

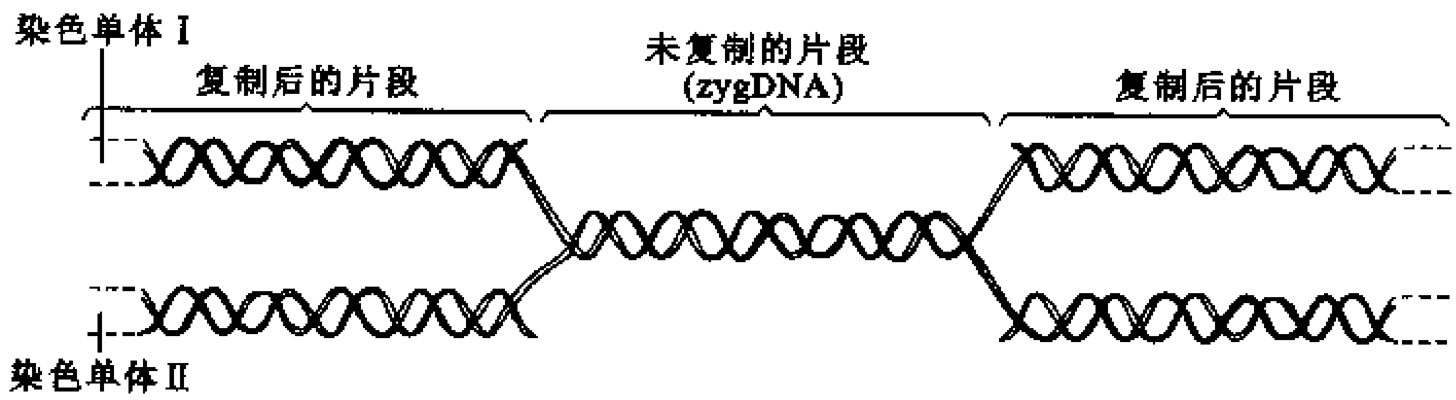
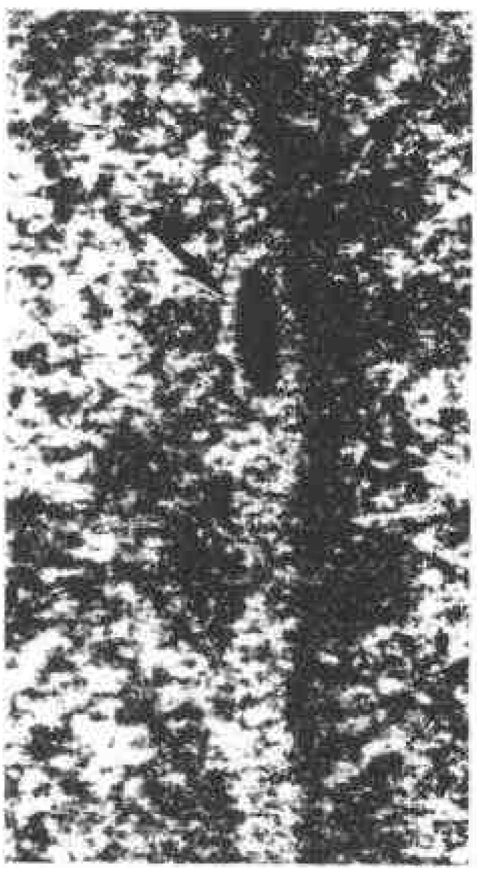


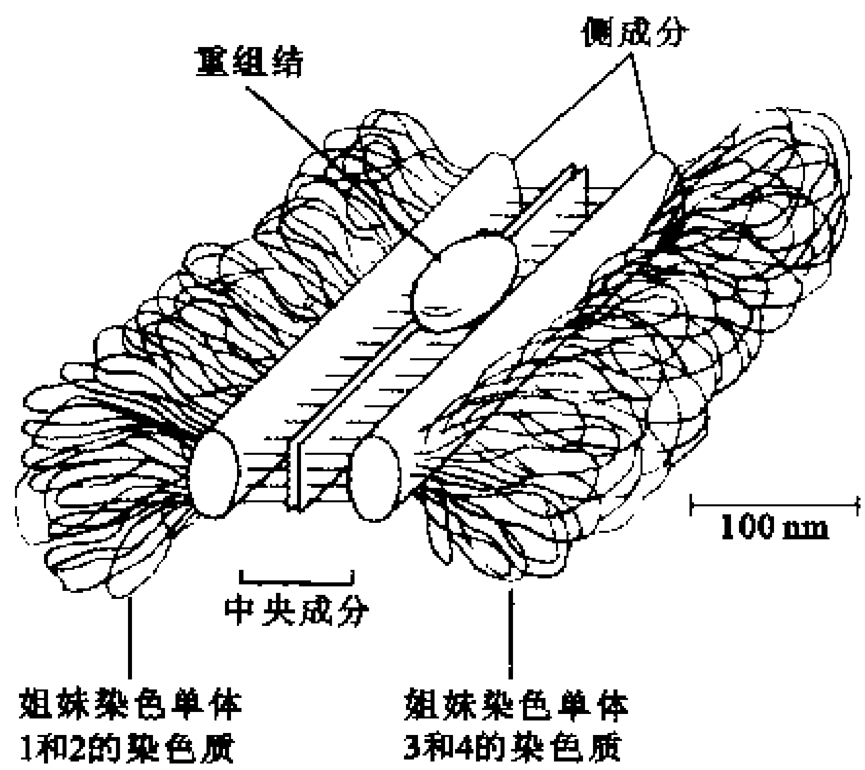
图11－25　一段等到减数分裂Ⅰ前期才进行复制的DNA片段(zygDNA)可能是由于此种未复制的DNA片段的存在，导致两条染色单体紧密联系在一起

偶线期(zygotene, zygonema)：主要发生同源染色体(homologous chromosome)配对(pairing)，即来自父母双方的同源染色体逐渐靠近，沿其长轴相互紧密结合在一起。因而，偶线期又称为配对期(pairing stage)。配对过程是专一性的，仅发生于同源染色体之间，非同源染色体之间不进行配对。关于同源染色体之间相互识别的机制，目前尚不清楚。配对以后，两条同源染色体紧密结合在一起所形成的复合结构，称为二价体(bivalent)。由于每个二价体由两条染色体构成，共含有4条染色单体，因而又称为四分体(tetrad)。但此时的四分体结构并不清晰可见。同源染色体配对的过程称为联会(synapsis)。联会初期，同源染色体端粒与核膜相连的接触斑相互靠近并结合。从端粒处开始，这种结合不断向其他部位伸延，直到整对同源染色体的侧面紧密联会。联会也可以同时发生在同源染色体的几个点上。在联会的部位形成一种特殊复合结构，称为联会复合体(synaptonemal complex)。联会复合体沿同源染色体长轴分布，宽约1.5～2 μm，在电镜下可以清楚地显示其细微结构(见图11－26)。联会复合体被认为与同源染色体联会和基因重组有关。在偶线期发生的另一个重要事件是合成在S期未合成的约0.3％的DNA(偶线期DNA，即zygDNA)。若用DNA合成抑制剂抑制zygDNA合成，联会复合体的形成将受到抑制。zygDNA在偶线期转录活跃。转录的RNA被称为zygRNA。zygDNA转录也被认为与同源染色体配对有关。

粗线期(pachytene,pachynema):开始于同源染色体配对完成之后。这一过程可以持续几天至几个星期。在此过程中,染色体进一步浓缩,变粗变短,并与核膜继续保持接触。同源染色体仍紧密结合,并发生等位基因之间部分DNA片段的交换和重组,产生新的等位基因的组合。此时在联会复合体部位的中间,出现一个新的结构,呈圆球形,椭球形或长约0.2 μm的棒状,称为重组结(recombination nodule)(图11-26)。重组结直径约90 nm,内含蛋白质等成分,结构尚不清楚。重组结可能直接参与基因重组。有些生物,在整个减数分裂过程中不出现重组结,因此中并无基因重组发生。在粗线期,也合成一小部分尚未合成的DNA,称为P-DNA。P-DNA大小约为100~1 000 bp,编码一些与DNA点切(nicking)和修复(repairing)有关的酶类。



A



B

图11-26 电镜下见到的联会复合体和重组结结构(A)及其图解(B)

A:照片显示两个联会复合体和重组结(箭头指示);B:图解显示侧成分、中央成分、重组结和同源染色体的姐妹染色单体(A,引自S.L.Wolfe;B,引自Alberts等人)

粗线期另一个重要的生化活动是,合成减数分裂期专有的组蛋白,并将体细胞类型的组蛋白部分或全部地置换下来。这种置换也许在一定程度上参与了基因重组过程,或反映出减数分裂前期染色体结构的变化。

在许多动物的卵母细胞发育过程中,粗线期还要发生rDNA扩增。即编码rRNA的DNA片段从染色体上释放出来,形成环形的染色体外DNA,游离于核质中,并进行大量复制,形成数千个拷贝的rDNA。如在非洲爪蟾(*Xenopus*)卵母细胞中,经过rDNA扩增,可以产生大约2 500个拷贝的rDNA。这些rDNA将参与形成附加的核仁,进行RNA转录。

双线期(diplotene,diplonema):重组阶段结束,同源染色体相互分离,仅留几

处相互联系。同源染色体的四分体结构变得清晰可见。同源染色体仍然相联系的部位称为交叉(crossover,chiasma)。交叉的数量变化不定。即使在同种物种的不同细胞之间,交叉的数量也不相同(图 11－27)。一般而言,在每个染色体臂上至少有一个交叉。在电镜下可见,交叉部位含有残留的联会复合体结构。

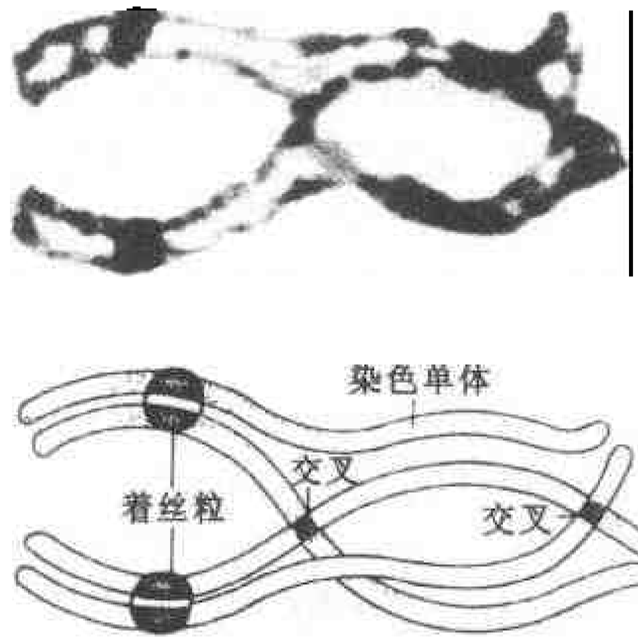


图 11－27　蝾螈精母细胞双线期二价染色体照片(上)及其图解(下)
可见 4 条染色单体,两个交叉,两个同源染色体各自的两个姐妹着丝粒并排存在(引自 DeRobertis)

许多动物在双线期阶段,同源染色体或多或少地要发生去凝集,RNA 转录活跃。关于染色体去凝集的程度,有的种类低到不易觉察,有的种类则高到几乎与一般间期细胞相似。在许多动物,尤其是鱼类、两栖类、爬行类和鸟类的雌性动物,染色体去凝集成一种特殊的巨大染色体结构,形状好像油灯的灯刷,称为灯刷染色体(lampbrush chromosome)。在灯刷染色体上有许多侧环结构,是进行活跃转录 RNA 的部位。RNA 转录、蛋白质翻译以及其他物质的合成等,是双线期卵母细胞体积增长所必需的(见第八章)。

目前比较清楚,在灯刷染色体侧环上合成的 RNA 主要为前体 mRNA。前体 mRNA 合成以后,很快被剪辑为 mRNA。有些种类的 mRNA,如编码组蛋白、核糖体蛋白和卵黄蛋白的 mRNA 很快会在细胞质中翻译为蛋白质。许多其他种类的 mRNA 则和蛋白质结合,以非活跃形式储备在卵母细胞质中。直到卵细胞成熟并受精以后,这些储备的 mRNA 才能转变为活跃状态,进行蛋白质翻译。在灯刷染色体一定的侧环上,也可以检测到 tRNA 和 5SrRNA 的转录。

双线期持续时间一般较长,其长短变化很大。两栖类卵母细胞的双线期可持续将近一年,而人类的卵母细胞双线期从胚胎期的第 5 个月开始,短者可持续十几年,到性成熟期开始;长者可达四五十年,到生育期结束。

终变期(diakinesis):染色体重新开始凝集,形成短棒状结构。如果有灯刷染色体存在,其侧环回缩,RNA 转录停止,核仁消失,四分体较均匀地分布在细胞核中。同时,交叉向染色体臂的端部移行。此移行过程称为端化(terminalization)。到达终变期末,同源染色体之间仅在其端部和着丝粒处相互联结。终变期的结束标志着前期Ⅰ的完成。

(2) 中期Ⅰ

前期Ⅰ结束,细胞逐渐转入分裂中期Ⅰ(metaphase Ⅰ)。在此过程中,要进行纺锤体装配。纺锤体形成过程和结构与一般有丝分裂过程中的相类似。到核膜破裂,标志着中期Ⅰ的开始。纺锤体微管侵入核区,捕获分散于核中的四分

体。四分体逐渐向赤道方向移动，最终排列在赤道面(equatorial plane)上。和有丝分裂不同的是，每个四分体含有4个动粒。其中一条同源染色体的两个动粒位于一侧，另一条同源染色体的两个动粒位于另一侧。从纺锤体一极发出的微管只与一个同源染色体的两个动粒相连，从另一极发出的微管也只与另一个同源染色体的两个动粒相连(见图11-28)。

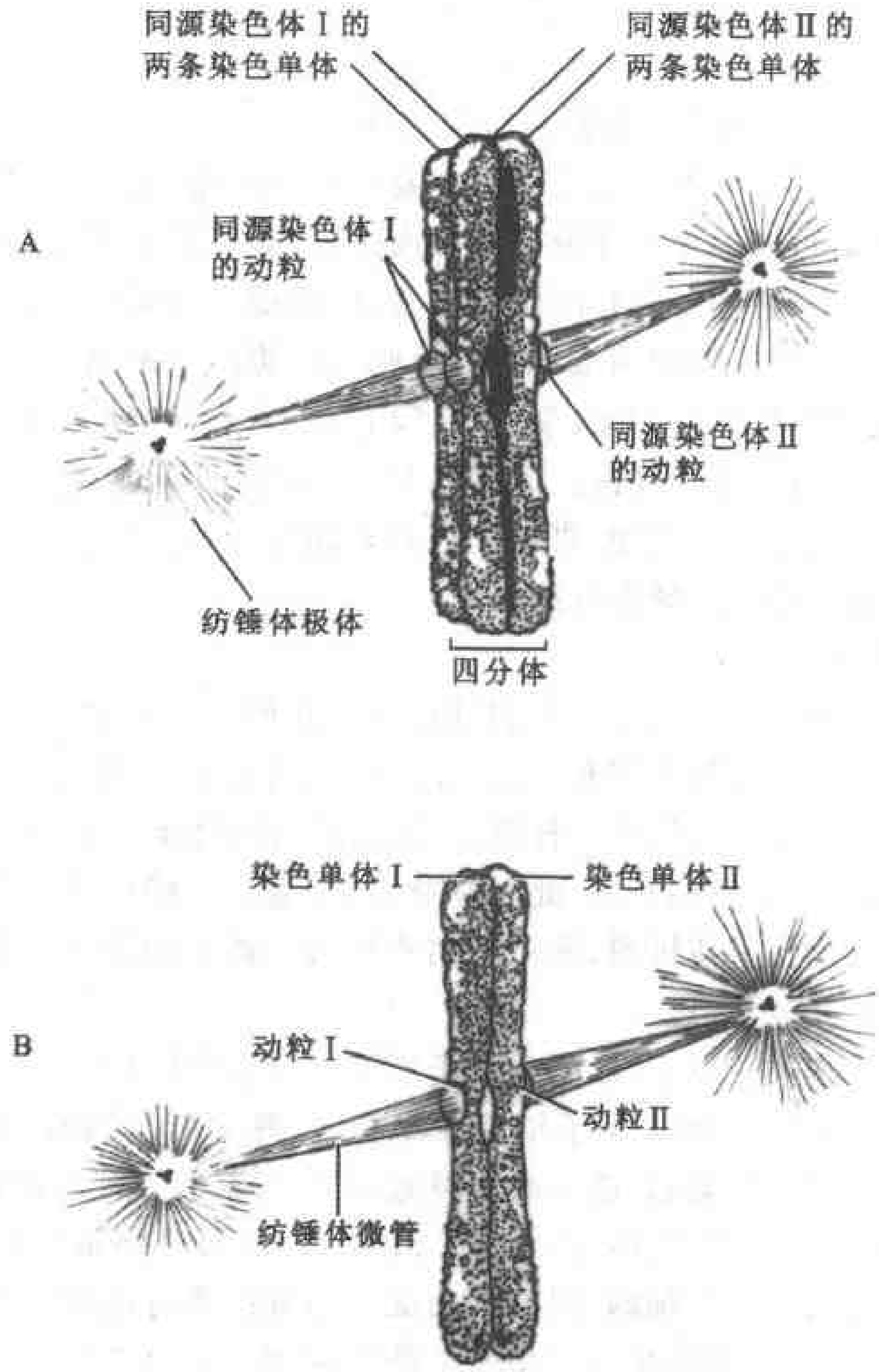


图11-28　减数分裂中期Ⅰ(A)与减数分裂中期Ⅱ(B)动粒与纺锤体的联系示意图

在减数分裂中期Ⅰ，四分体中同源染色体的两个动粒位于同侧，只与从同一极发出的纺锤体微管相联结；减数分裂中期Ⅱ与一般有丝分裂中期相似，每个染色体的两个动粒分别位于染色体的两侧，分别与从两极发出的纺锤体微管相联结

(3) 后期Ⅰ

同源染色体对相互分离并向两极移动，标志着后期Ⅰ(anaphaseⅠ)的开始。移向两极的同源染色体均是含有两条染色单体的二倍体。其结果是，到达每一

极的染色体的数量为细胞内染色体总数量的一半。另外，各四分体之间同源染色体向两极移动是一个随机的过程，因而到达两极的染色体会出现许许多多的排列方式。如人类细胞有 23 对染色体，从理论上讲将会产生 2^{23}种不同的排列方式。如此庞大的排列方式，即使不发生基因重组，得到遗传上完全相同的配子概率也只有$\frac{1}{8\ 400\ 000}$。再加上基因重组和精子与卵子的随机结合，要想得到遗传上完全相同的个体几乎是不可能的，除非是同卵双生个体，其遗传性状可能相同。

(4) 末期Ⅰ，胞质分裂Ⅰ和减数分裂间期

经过后期Ⅰ后，细胞进一步的变化主要有两种类型：第一种类型，染色体到达两极，并逐渐进行去凝集。在染色体的周围，核被膜重新装配，形成两个子细胞核。同时，随着染色体分离并向两极移动，细胞质也开始分裂，完全形成两个间期子细胞。此时的间期细胞虽具有一般间期细胞的基本结构特征，但又有着重要区别，即它们不再进行 DNA 复制，也没有 G_1、S 和 G_2 期之分。间期持续时间一般较短，有的仅作短暂停留。为区别于一般细胞间期，特将其称为减数分裂间期(interkinesis)；第二种类型，即细胞进入末期后，不是完全回复到间期阶段，而是立即准备进行第二次减数分裂。

2. 第二次减数分裂

第二次减数分裂过程与有丝分裂过程非常相似。即经过分裂前期Ⅱ、中期Ⅱ、后期Ⅱ、末期Ⅱ和胞质分裂Ⅱ等几个过程。每个过程中细胞形态变化也与有丝分裂过程相似。对于上述第二种类型，染色体到达两极后，减数分裂Ⅰ的纺锤体去装配，两极的中心粒和星体，此时一分为二，重新装配成两个纺锤体。染色体在原来两极的位置重新排列，形成新的赤道板。此时即为中期Ⅱ。此后的发展则与一般有丝分裂相似。

经过第二次减数分裂，共形成 4 个子细胞。但它们以后的命运随生物种类不同而不同。在雄性动物，4 个子细胞大小相似，称为精子细胞，将进一步发展成为 4 个精子。在雌性动物，第一次分裂为不等分裂，即第一次分裂后产生一个大的卵母细胞和一个小的极体，称为第一极体。第一极体将很快死亡解体，有时也会进一步分裂为两个小细胞，但没有功能。卵母细胞将继续进行第二次减数分裂，也为不等分裂。其结果是产生一个卵细胞和一个第二极体。第二极体也没有功能，很快解体。因此，雌性动物减数分裂仅形成一个有功能的卵细胞。高等植物减数分裂与动物减数分裂类似，即雄性产生 4 个有功能活性的精子，而雌性仅产生一个有功能活性的卵细胞。

(三) 减数分裂过程的特殊结构及其变化

1. 性染色体的分离

不同性别之间，其性染色体构成不同。绝大多数雌性动物细胞的两条性染色体构成为 XX，而雄性细胞性染色体为 XY 或 XO(即无 Y 染色体)。也有一些种类正好相反，雄性为 XX 两条染色体，雌性为 XY 两条染色体。对于含有两条

XX性染色体的细胞，两条XX染色体像常染色体一样进行正常配对、交换和分离。而含有XY性染色体的细胞，两条性染色体的形态结构不同，基因含量也不同。在前期Ⅰ，两者是如何配对和分离的呢？一般讲，有些物种的XY染色体间可能会含有一些同源区段，有的可能不含任何同源区段。对于含有同源区段的XY染色体，如人类的XY染色体，在前期Ⅰ可以进行配对。不管XY染色体配对与否，两者都将和常染色体一样，在分裂中期Ⅰ排列到赤道面上。其后，随常染色体分离而相互分离，并各自移向两极。到第二次减数分裂，XY染色体和常染色体一样，其两条染色单体再进行分离。偶尔也可出现XY染色体的染色单体在第一次减数分裂时就相互分离的现象，致使产生的两个细胞各含有一个X染色单体和一个Y染色单体。到第二次减数分裂时，每个细胞的X和Y染色单体再分配到两个细胞中。

对于XO物种（主要是昆虫），在第一次减数分裂时，X染色体移向一极。结果将产生一个含X染色体的细胞和一个不含性染色体的细胞。到第二次减数分裂，含X染色体的细胞分裂为两个含X染色单体的细胞；不含性染色体的细胞也一分为二，形成两个不含性染色体的细胞。偶尔也可以看到X染色体的两个染色单体在第一次减数分裂时即相互分离，产生两个各含一个X染色单体的细胞。到第二次减数分裂时，X染色单体仅分配到一个细胞中。其最终结果是，一个XO细胞经过减数分裂，产生两个含X染色体的细胞和两个无性染色体的细胞。

2. 联会复合体和基因重组

联会复合体是同源染色体之间在减数分裂前期联会时所形成的一种临时性结构。这种结构是M.J.Moses于1963年用电镜观察蝲蛄卵母细胞时发现的。随后证实，联会复合体在动物和植物减数分裂过程中广泛存在。联会复合体在同源染色体联会处沿同源染色体长轴分布，由位于中间的中央成分（central element）和位于两侧的侧成分（Lateral element）共同构成。侧成分的外侧则为配对的同源染色体（图11－29）。联会复合体中央成分宽约100 nm，侧成分宽约20～40 nm。从两侧的侧成分向中央成分方向发出横向纤维（transverse fibers），交会于中央成分的中间部位。

蛋白质是联会复合体的主要组成成分之一。用胰蛋白酶、链霉蛋白酶等处理联会复合体，其中央成分、侧成分以及横向纤维等结构消失。Moens实验室等曾经分离出几种联会复合体结构蛋白，并用其制备了特异抗体。用免疫电镜方法证实，其中有两种小分子蛋白位于侧成分，两者的相对分子质量分别为30×10^3和33×10^3。第三种蛋白的相对分子质量为125×10^3，位于中央成分。第四种蛋白的相对分子质量约为190×10^3，既分布于侧成分，也分布于中央成分。这些蛋白分子的功能尚不清楚。另外，用同样方法也证明，DNA拓扑酶Ⅱ存在于侧成分和其周围的染色质中。

DNA片段也是联会复合体的组成成分之一。这些DNA片段多位于50～550 bp之间。它们很可能是挂在或包含与侧成分的染色体纤维的部分DNA片

段。Moens 等人用 DNA 酶消化分离的多线染色体，发现这些 DNA 片段被联会复合体保护而免遭 DNA 酶消化。序列分析显示，这些 DNA 片段中并无特殊的 DNA 序列。不同细胞之间，这些 DNA 片段的大小和碱基的排列顺序会有明显差别。这些结果提示，DNA 与联会复合体结合不需要特殊的 DNA 序列；染色体的任何部分都可能与联会复合体的侧成分结合。这些 DNA 片段很可能完全穿越侧成分而进入中央成分，在此处参与同源染色体的基因重组。

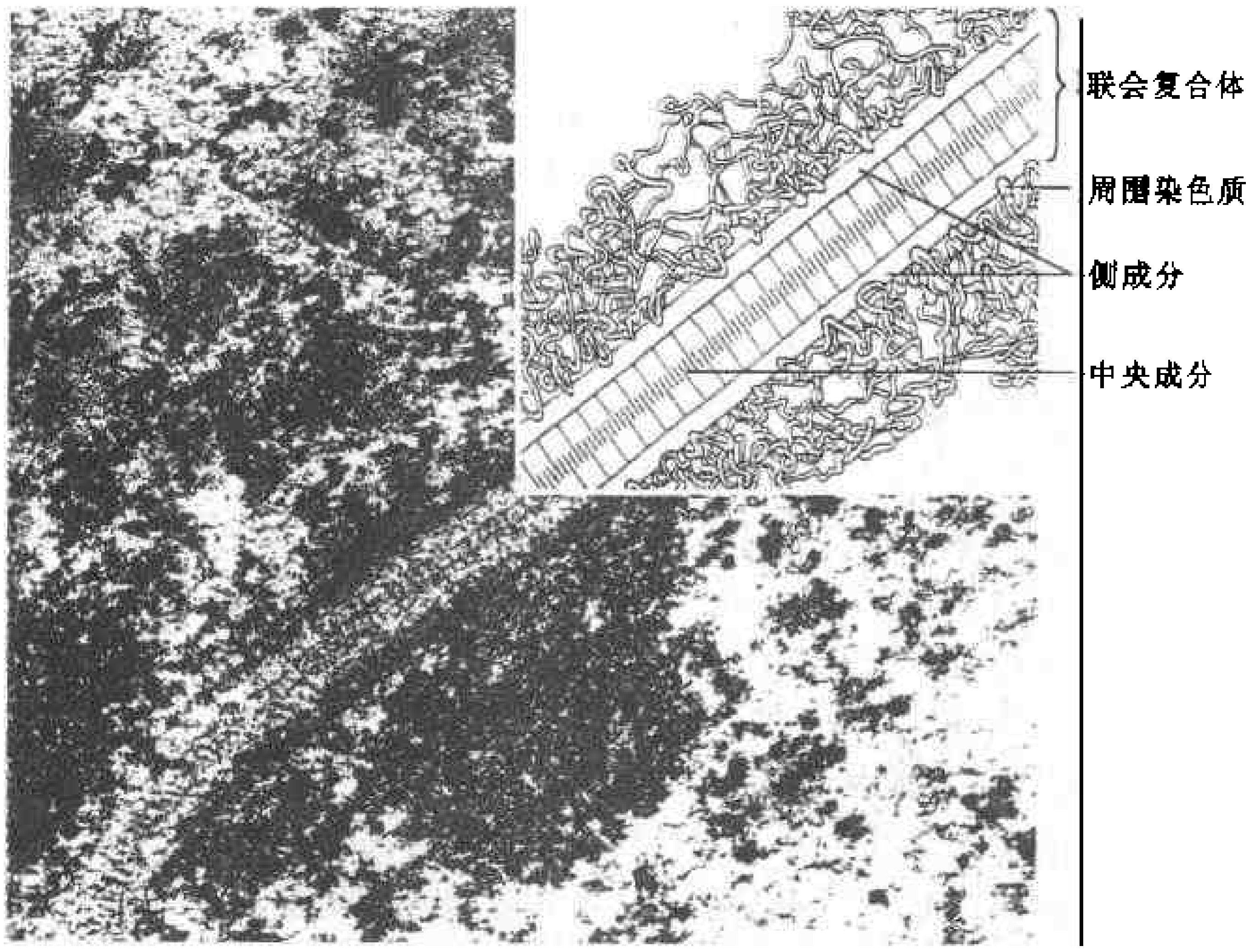


图 11－29　蝗虫粗线期的联会复合体(引自 S.L.Wolfe)
框内为联会复合体于染色质纤维之间的关系图解

在中央成分和侧成分中还发现有 RNA。因此，联会复合体中可能含有核糖核蛋白复合物。

联会复合体被认为从细线期开始装配，到偶线期形成明显的联会复合体结构。到达粗线期，重组结开始装配。

第二节　细胞周期的调控

为确保细胞周期这一生命增殖过程有条不紊地进行，细胞内发展了一系列调控机制，对这一过程进行严格地监控。人们开展细胞周期调控研究已有几十年历史。在 20 世纪 50～60 年代，S 期的发现和细胞周期中 4 个时期的划分，使细胞周期调控研究辉煌多时。最近 10 年，细胞周期调控研究再现辉煌，并取得了突飞猛进的发展，获得了许多突破性成果。

一、MPF 的发现及其作用

MPF，即卵细胞促成熟因子(maturation-promoting factor)，或细胞促分裂因子(mitosis-promoting factor)，或 M 期促进因子(M phase-promoting factor)。MPF 最早发现并被命名于 20 世纪 70 年代初期。近期的工作不仅逐步鉴定了 MPF 的构成，同时也逐步证明了其在细胞周期调控中的重要作用。

1970 年，Johnson 和 Rao 将 HeLa 细胞同步化在细胞周期中的不同时期，然后将 M 期细胞与其他间期细胞在仙台病毒介导下融合，并继续培养一定时间。他们发现，与 M 期细胞融合的间期细胞发生了形态各异的染色体凝集，并称之为染色体超前凝集(premature chromosome condensation，PCC)。此种染色体则称为超前凝聚染色体。不同时期的间期细胞与 M 期细胞融合，产生的 PCC 的形态各不相同。G_1 期 PCC 为细单线状；S 期 PCC 为粉末状；G_2 期 PCC 为双线染色体状(图 11－30)。PCC 的这种形态变化可能与 DNA 复制状态有关。染色体超前凝集在其他细胞中也被证明。M 期细胞可以诱导 PCC，提示在 M 期细胞中可能存在一种诱导染色体凝集的因子，称为细胞促分裂因子。

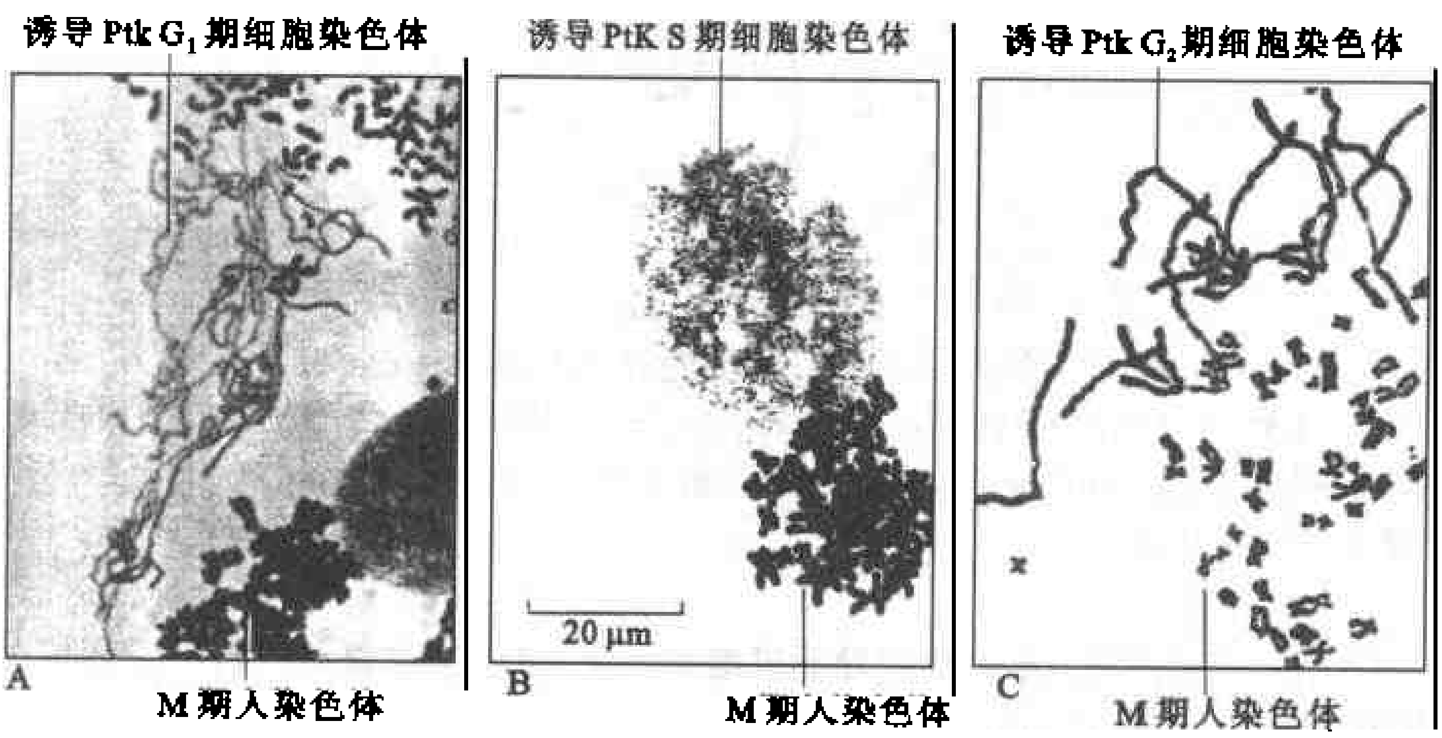


图 11－30 人类 M 期细胞与袋鼠(PtK)G_1、S 和 G_2 期细胞融合诱导成熟染色体凝集
(引自 B. Alberts 等人)
A：M 期细胞与 G_1 期细胞融合；B：M 期细胞与 S 期细胞融合；C：M 期细胞与 G_2 期细胞融合

1971 年，Masui 和 Markert 用非洲爪蟾卵做实验，明确提出了 MPF 这一概念。非洲爪蟾卵细胞发育过程可以划分为 6 个阶段，即第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ期。第Ⅰ至Ⅳ期为卵母细胞生成和生长阶段。第Ⅳ期卵母细胞达到一定体积，停止生长，等待成熟。此时的卵母细胞处于第一次减数分裂期前期阶段，含有一个体积较大的细胞核，称为生发泡(germinal vesicle，GV)。卵母细胞成熟需要雌性激素孕酮的刺激。在孕酮作用下，卵母细胞向Ⅴ和Ⅵ期转化，生发泡破裂(GV

broken down ,GVBD),染色体凝集,进行第一次减数分裂;然后立即进行第二次减数分裂,并停留在分裂中期,即成熟的卵细胞(第Ⅵ期卵细胞)。卵细胞受精后,形成受精卵,很快便开始卵裂(图 11-31)。Masui 和 Markert 用解剖方法分离第Ⅳ期卵母细胞,并用孕酮进行体外刺激,诱导卵母细胞成熟,然后进行细胞质移植实验。他们发现,将孕酮诱导成熟的卵细胞的细胞质注射到卵母细胞中,可以诱导后者成熟;再将后者的细胞质少量注射到一些新的卵母细胞中,这些新的卵母细胞仍被诱导成熟;再将刚被诱导成熟的卵细胞的细胞质少量注射到另一些新的卵母细胞中,仍然可以诱导卵母细胞成熟(图 11-32)。因而他们认为,在成熟的卵细胞的细胞质中,必然有一种物质,可以诱导卵母细胞成熟。他们将这种物质称作促成熟因子,即 MPF。

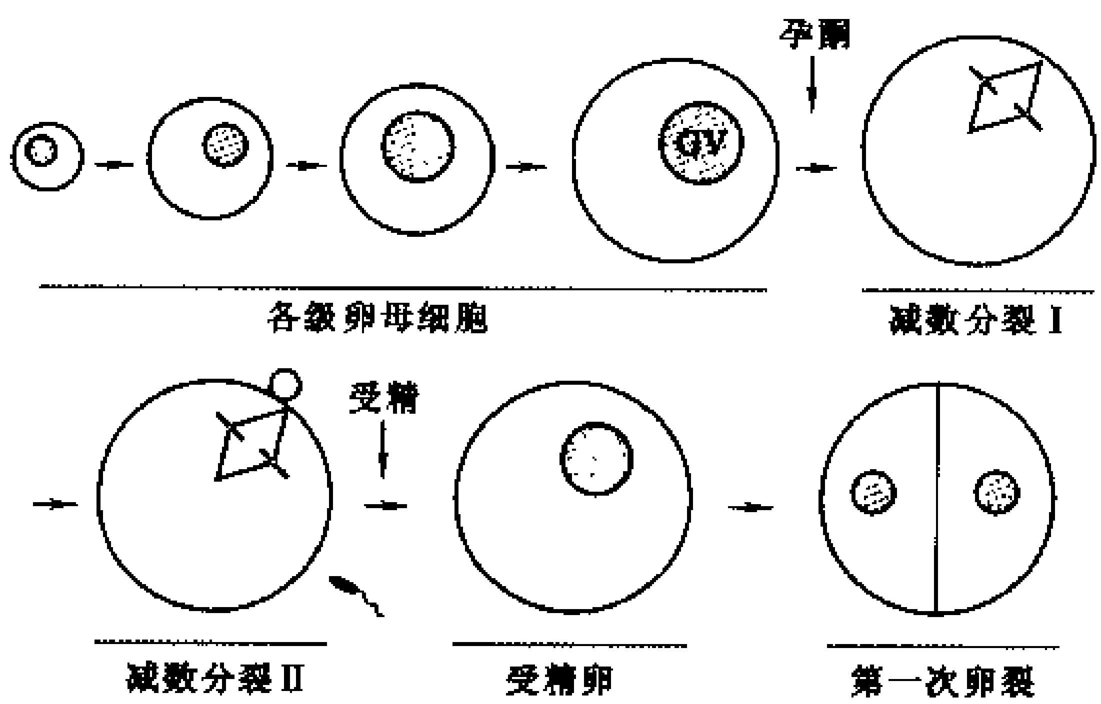


图 11-31　非洲爪蟾卵细胞成熟过程、受精和第一次卵裂示意图

非洲爪蟾卵母细胞成熟过程可以人为地划分为六个时期,第Ⅰ至Ⅳ期为各级生长卵母细胞,第Ⅳ期卵母细胞在孕酮作用下向第Ⅴ和第Ⅵ期转化,进而第Ⅰ和第Ⅱ次成熟分裂。成熟卵细胞受精后,很快便开始第一次卵裂

进一步研究发现,用孕酮诱导卵母细胞成熟,卵母细胞需要进行一定程度的蛋白质合成。在有蛋白质合成抑制剂存在的情况下,孕酮不能诱导卵母细胞成熟。成熟卵细胞的细胞质诱导卵母细胞成熟,则不需要蛋白质合成;在蛋白质合成抑制剂存在的情况下,也可以诱导卵母细胞成熟。这些实验结果提示,在成熟卵母细胞中,MPF 已经存在,只是处于非活性状态,被称为前体 MPF(preMPF)。非活性态的前体 MPF 通过翻译后修饰,可以转化为活性态的 MPF。

MPF 被发现以后,不少学者便着手 MPF 的纯化工作,但一直进展缓慢,直到 1988 年,才取得突破性进展。1988 年,Maller 实验室的 Lohka 等人以非洲爪蟾卵为材料,分离获得了微克级的纯化 MPF,并证明其主要含有 p32 和 p45 两种蛋白。p32 和 p45 结合后,表现出蛋白激酶活性,可以使多种蛋白质底物磷酸化。因而证明,MPF 是一种蛋白激酶。

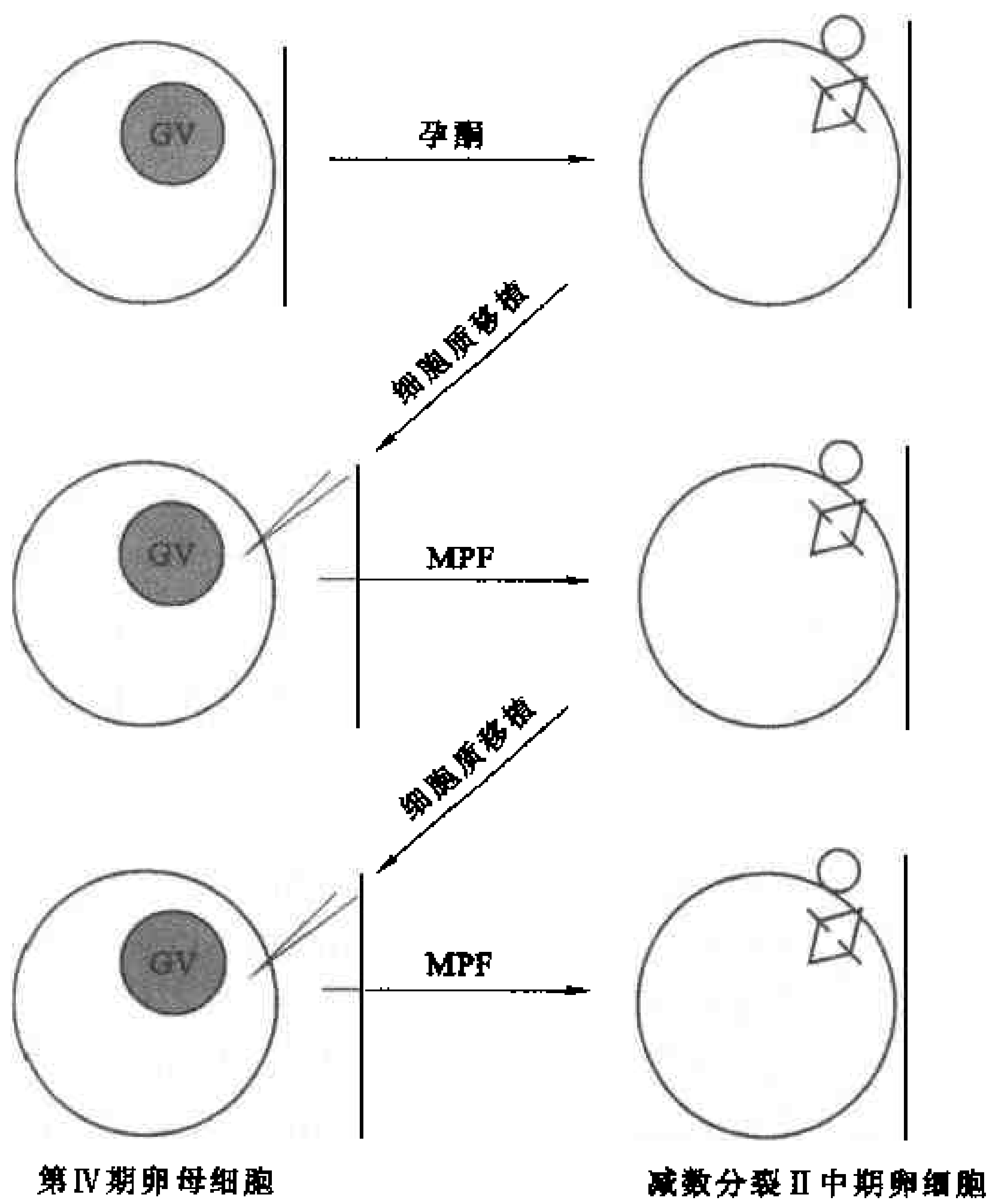


图 11－32　成熟卵细胞质移植发现 MPF 的存在

二、p34^{cdc2}激酶的发现及其与 MPF 的关系

与 MPF 研究工作的同时，另一批生物学家则以酵母为材料，从另一个侧面对细胞周期调控进行着深入研究。以 L. Hartwell 为代表的酵母遗传学家在不同温度条件下培养芽殖酵母，分离获得了数十个温度敏感突变体（temperature-sensitive(ts)mutants）。对芽殖酵母来说，允许温度常常位于 20～23℃之间，限定温度（restrictive temperature）通常为 35～37℃。突变体最基本的特点是，在允许温度条件（permissive temperature）下，可以正常分裂繁殖，而在限定温度条件下，则不能正常分裂繁殖。这种在限定温度下失去正常分裂繁殖能力的现象，是由于某个基因发生突变而引起的。不同的突变体，发生突变的基因不同；在限定温度下，细胞在细胞周期中所停留的时期以及细胞所表现出的形态结构也常常是不同的。因而可以对不同突变体的基因变化和基因表达进行综合分析。以 P. Nurse 为代表的另一批酵母生物学家在不同温度下培养裂殖酵母细胞，也分离出了数十个温度敏感突变体。和芽生酵母类似，在限定温度下，不同突变体的某个基因也发生突变，其细胞停留在细胞周期中的某个特定时期。酵母中这些

与细胞分裂和细胞周期调控有关的基因，被称为 *cdc*(cell division cycle)基因。人们根据 *cdc* 基因被发现的先后顺序等，对这些基因进行了命名，如 *cdc2*、*cdc25*、*cdc28* 等，尽管当时 *cdc* 基因尚未被分离出来。

cdc2 基因是裂殖酵母细胞中最重要的基因之一。*cdc* 基因突变导致细胞停留在 G_2/M 交界处。*cdc2* 基因也是第一个被分离出来的 *cdc* 基因。它的表达产物为一种相对分子质量为 34×10^3 的蛋白，被称为 $p34^{cdc2}$。进一步研究发现，$p34^{cdc2}$ 具有蛋白激酶活性，可以使多种蛋白底物磷酸化。因而被称为 $p34^{cdc2}$ 激酶。$p34^{cdc2}$ 激酶在裂殖酵母细胞周期调控过程中，起着关键性调节作用。在芽殖酵母中也有一个关键性的 *cdc* 基因，称为 *cdc28*。*cdc28* 基因突变，芽殖酵母细胞或者停留在 G_1/S 交界处，或者停留在 G_2/M 交界处。*cdc28* 基因是继 *cdc2* 基因之后，第二个被分离出来的 *cdc* 基因。*cdc28* 基因产物也是一种相对分子质量为 34×10^3 的蛋白，称为 $p34^{cdc28}$。$p34^{cdc28}$ 也是一种蛋白激酶，在 G_2/M 转换过程中起着中心调节作用，因而是 $p34^{cdc2}$ 的同源物。同时，$p34^{cdc28}$ 对 G_1/S 转换，也是必需的。更进一步研究发现，不管是 $p34^{cdc2}$，或者是 $p34^{cdc28}$，其本身并不具有激酶活性，只有当其与有关蛋白结合后，其激酶活性才能够表现出来。例如，$p34^{cdc2}$ 必须和另一种蛋白 $p56^{cdc13}$ 结合，才具有激酶活性。

知道 $p34^{cdc2}$ 与 MPF 都具有激酶活性并促进 G_2/M 转换以后，人们不禁要问，$p34^{cdc2}$ 和 MPF 有何关系呢？当 MPF 的基本构成被确认以后，James Maller 实验室和 Paul Nurse 实验室立即开始合作，很快便证明 MPF 中的 p32 可以被 $p34^{cdc2}$ 特异抗体所识别，并且 $p34^{cdc2}$ 多肽片段可以加速 MPF 活性，表明两者为同源物。其同源性为后来的序列分析进一步证明。了解 p32 与 $p34^{cdc2}$ 以后，人们进一步提出，蛙 MPF 的 p45 和酵母的 $p56^{cdc13}$ 是否也有一定关系呢？

与上述工作开展的同时，以 Tim Hunt 为代表的另一些科学家正以海胆卵为材料，对细胞周期调控进行着深入的研究。他们(Evans, *et al*.)于 1983 年报道，在海胆卵细胞中存在有两种特殊蛋白质。这两种蛋白质的含量随细胞周期进程变化而变化，一般在细胞间期内积累，在细胞分裂期内消失，在下一个细胞周期中又重复这一消长现象。因而他们将这两种蛋白质命名为细胞周期蛋白(cyclin，以下称周期蛋白)。随后，这些周期蛋白很快便被分离和克隆出来，并被证明广泛存在于从酵母到人类等各种真核生物中。进一步研究证明，周期蛋白为诱导细胞进入 M 期所必需。而且，各种生物之间的周期蛋白在功能上有着广泛的互补性。将海胆周期蛋白 B 的 mRNA 引入到非洲爪蟾卵非细胞体系中，其翻译产物可以诱导该非细胞体系进行多次细胞周期循环。将一种基因工程表达的抗降解的周期蛋白 Δ90 引入非洲爪蟾卵非细胞体系或直接显微注射到非洲爪蟾卵细胞中，可以稳定 MPF 活性。所有这些实验结果，均提示周期蛋白可能参与 MPF 的功能调节。当 MPF 被提纯以后，James Maller 实验室和 Tim Hunt 实验室立即开始合作，并很快证明 MPF 的另一种主要成分为周期蛋白 B。序列分析证明，周期蛋白 B 与酵母的 $p56^{cdc13}$ 为同源物。至此，MPF 的生化成分便被确定下来，它含有两个亚单位，即 Cdc2 蛋白和周期蛋白。当两者结合后，表现出

蛋白激酶活性。Cdc2 为其催化亚单位，周期蛋白为其调节亚单位。

三、周期蛋白

自 1983 年首次发现周期蛋白后，许多科学家纷纷开展周期蛋白研究。在短短的 10 年间，人们便从各种生物体中克隆分离了数十种周期蛋白，如酵母的 Cln1、Cln2、Cln3、Clb1～Clb6，高等动物的周期蛋白 A1、A2、B1、B2、B3、C、D1、D2、D3、E1、E2、F、G、H 等等。这些周期蛋白在细胞周期内表达的时期有所不同，所执行的功能也多种多样。这些周期蛋白有的只在 G_1 期表达并只在 G_1 期和 S 期转化过程中执行调节功能，所以常被称为 G_1 期周期蛋白，如 C、D、E、Cln1、Cln2、Cln3 等；有的虽然在间期表达和积累，但到 M 期时才表现出调节功能，所以常被称为 M 期周期蛋白，如周期蛋白 A、B 等。G_1 期周期蛋白在细胞周期中存在的时间相对较短。M 期周期蛋白在细胞周期中则相对稳定。

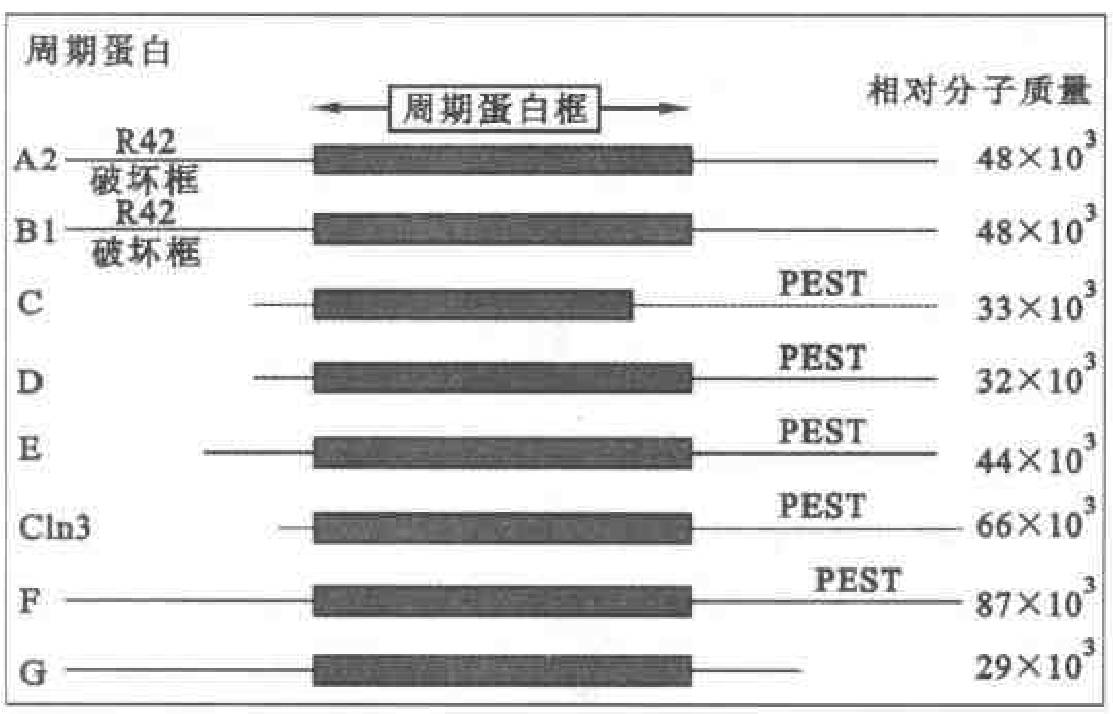


图 11－33　部分周期蛋白分子结构特征

图中显示的，除 Cln3 外，均为人类的周期蛋白分子。所有这些分子均含有一个周期蛋白框。M 期周期蛋白(A2,B1)分子的 N 端含有一个破坏框。G_1 期周期蛋白分子的 C 端含有一个 PEST 序列

各种周期蛋白之间有着共同的分子结构特点，但也各有特性。首先，它们均含有一段相当保守的氨基酸序列，称为周期蛋白框(cyclin box)(如图 11－33)。周期蛋白框约含有 100 个左右的氨基酸残基。周期蛋白框介导周期蛋白与 CDK 结合。不同的周期蛋白框识别不同的 CDK，组成不同的周期蛋白－CDK 复合体，表现出不同的 CDK 激酶活性。M 期周期蛋白的分子结构含有另一个特点。在这些蛋白质分子的近 N 端含有一段由 9 个氨基酸组成的特殊的序列，称为破坏框(destruction box，RXXLGXIXN)(X 代表可变性氨基酸)。在破坏框之后，为一段约 40 个氨基酸组成的赖氨酸富集区。破坏框主要参与由泛素

(ubiquitin)介导的周期蛋白 A 和 B 的降解。G_1 期周期蛋白分子中不含破坏框，但其 C 端含有一段特殊的 PEST 序列。据认为 PEST 序列与 G_1 期周期蛋白的更新有关。

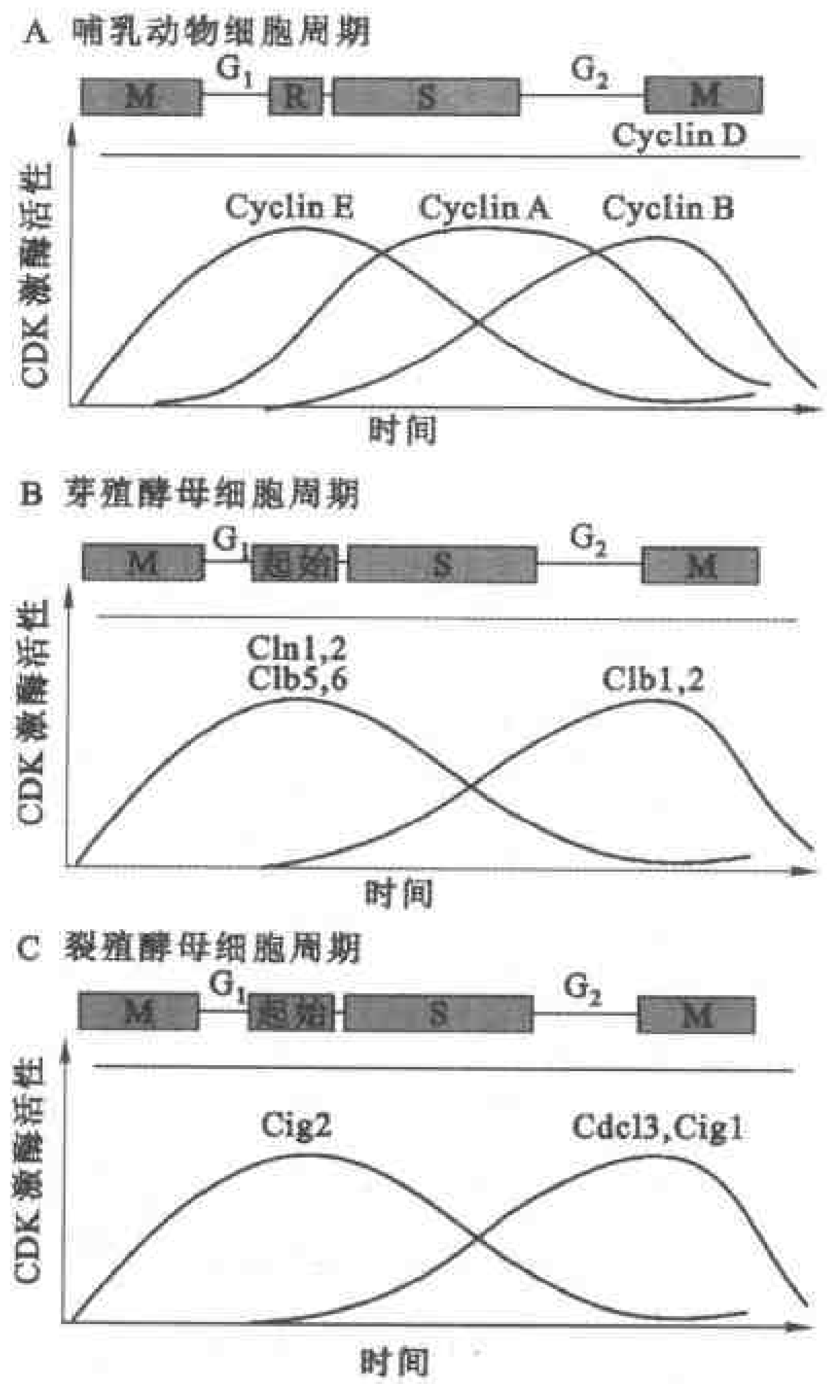


图 11－34 部分哺乳动物和酵母细胞周期蛋白在细胞周期中的积累及其与 CDK 激酶活性的关系

不同的周期蛋白在细胞周期中表达的时期不同，并与不同的 CDK 结合，调节不同的 CDK 激酶活性。图 11－34 显示了几种周期蛋白在哺乳动物细胞和酵母细胞中的表达和积累状况。在哺乳动物细胞中，周期蛋白 A 在 G_1 期的早期即开始表达并逐渐积累，到达 G_1/S 交界处，其含量达到最大值并一直维持到 G_2/M 期。周期蛋白 B 则从 G_1 期晚期开始表达并逐渐积累，到 G_2 期后期阶段达到最大值并一直维持到 M 期的中期阶段，然后迅速降解。作为 G_1 期周期蛋白的周期蛋白 D 在细胞周期中持续表达，而周期蛋白 E 则在 M 期的晚期和 G_1 期早期开始表达并逐渐积累，到达 G_1 期的晚期，其含量达到最大值，然后逐渐下降，到达 G_2 期的晚期，其含量降到最低值。在裂殖酵母和芽殖酵母中，周期蛋白含量的消长情况与哺乳动物细胞中的有许多相似之处。作为 M 期周期蛋

白，芽殖酵母中的 Clb1、Clb2 和裂殖酵母中的 Cdc13、Cig1 均在 G_1 期的后期开始表达，到 G_2 期达到最大值，到达 M 期中期后则迅速消失。作为 G_1 期周期蛋白，芽生酵母中的 Cln1、Cln2 和裂殖酵母中的 Cig2 则在 M 期的后期开始表达，到达 G_1 期后期的"起始点"前，其含量达到最大值，然后逐渐降低，到达 G_2 期时降到最低值。另外，在裂殖酵母中还发现其他两种 B 类周期蛋白 Clb3、Clb4。两者的表达早于 Clb1 和 Clb2。但对其功能尚了解不多。有人推测它们可能在 G_1/S 转化和 S 期中起调节作用。

对于其他种类的周期蛋白的功能研究，有的已经取得重要进展，有的尚在积极研究之中。

四、CDK 激酶和 CDK 激酶抑制物

当酵母 *cdc 2* 和 *cdc28* 基因被分离出来后，几个实验室便立即着手 *cdc2* 或 *cdc28* 类同基因的分离工作。他们首先通过 PCR 技术构建了人类、非洲爪蟾和果蝇的 cDNA 文库；然后对 cDNA 文库进行筛选。结果成功分离到了 10 多个 *cdc2* 相关基因。通过基因序列和蛋白质功能分析，证明有的确实是 *cdc2* 类同基因。与酵母 *cdc2* 基因相比较，不仅同源性强，在蛋白质功能方面也有很强的互补性。也有的不仅在序列方面与 *cdc2* 有一定差异，在蛋白质功能方面也表现出一定的特殊性。但是，它们又含有两个共同的特点：一个是它们含有一段类似的氨基酸序列，另一个是它们都可以与周期蛋白结合，并将周期蛋白作为其调节亚单位，进而表现出蛋白激酶活性。因而，它们被统称为周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase)，简称 CDK 激酶。目前已经发现并命名的 CDK 激酶包括 Cdc2、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7 和 CDK8 等。由于 Cdc2 第一个被发现，而其他几个 CDK 激酶则是通过与其相比较而得来，因而 Cdc2 激酶被命名为 CDK1。不同的 CDK 激酶所要求结合的周期蛋白不同；在细胞周期中执行的调节功能也不相同。对不同的 CDK 激酶的功能认识，有的比较清楚，有的正在深人。某些 CDK 与周期蛋白的配对关系，见表 11－2。

表 11－2　某些 CDK 与周期蛋白的配对关系及执行功能的时期

CDK 种类	可能结合的周期蛋白	执行功能的可能时期
CDK1($p34^{cdc2}$)	A,B1,B2,B3	G_2/M
CDK2	A,D1,D2,D3,E	G_1/S,S
CDK3		G_1/S
CDK4	D1,D2,D3	G_1/S
CDK5	D1,D3	
CDK6	D1,D2,D3	G_1/S
CDK7	H	
CDK8	C	

各种 CDK 分子均含有一段类似的 CDK 激酶结构域(CDK kinase domain)。与 CDK1 激酶结构域相比，其他几种 CDK 激酶结构域的保守程度有所不同(图

11－35)。但是,在 CDK 激酶结构域中,有一小段序列则相当保守,即 PSTAIRE 序列。据认为,此序列与周期蛋白结合有关。此外,在 CDK 分子中也发现一些重要位点。对这些位点进行磷酸化修饰,将对 CDK 激酶活性起重要调节作用。细胞内存在多种因子,对 CDK 分子结构进行修饰,参与 CDK 激酶活性的调节。

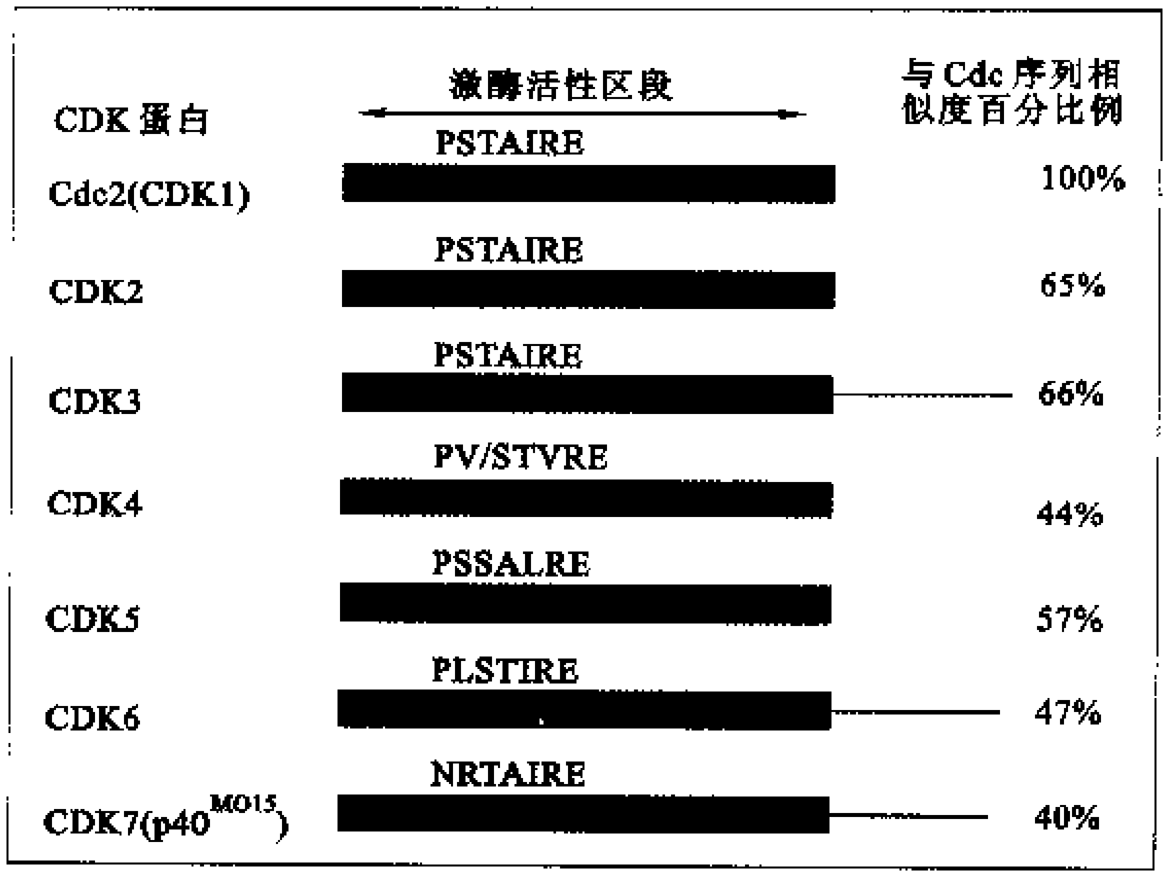


图 11－35　通过 PCR 技术测定的与 Cdc2 类似的 CDK 蛋白分子图解

图中以 Cdc2(CDK1)氨基酸序列为标准(100%),将其他 CDK 激酶活性区段(kinase domain)的氨基酸序列与其比较,得到序列相似度百分比(参考 Hutchison 和 Glover 图绘制)

除周期蛋白和上述修饰性调控因子对 CDK 激酶活性进行调控之外,细胞内还存在一些对 CDK 激酶活性起负性调控的蛋白质,称为 CDK 激酶抑制物(cyclin-dependent kinase inhibitors,CDKI)。到目前为止,已经发现多种对 CDK 激酶起负性调控的 CDKI,分别归为 CIP/KIP 家族和 INK4 家族。CIP/KIP 家族成员主要包括 $p21^{CIP/WAF1}$、$p27^{KIP1}$ 和 $p57^{KIP2}$,$p21^{CIP/WAF1}$ 为此家族的典型代表。p21 主要对 G_1 期 CDK 激酶(CDK2、CDK3、CDK4 和 CDK6)起抑制作用。p21 还可以与 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)直接结合。PCNA 是 DNA 复制聚合酶 δ 的辅助因子,为 DNA 复制所必需。P21 与 PCNA 结合,可以直接抑制 DNA 复制。INK 家族成员主要包括 p16、p15、p18 和 p19 等,p16 为此家族的典型代表。p16 主要抑制 CDK4 和 CDK6 激酶活性。

五、细胞周期运转调控

目前已经公认,CDK 激酶对细胞周期起着核心性调控作用。不同种类的周期蛋白与不同种类的 CDK 结合,构成不同的 CDK 激酶。不同的 CDK 激酶在细胞周期的不同时期表现出活性,因而对细胞周期的不同时期进行调节。例如,与

G_1期周期蛋白结合的CDK激酶在G_1期起调节作用，与M期周期蛋白结合的CDK激酶在M期起调节作用。

（一）G_2/M期转化与CDK1激酶的关键性调控作用

如上所述，CDK1激酶即MPF，或$p34^{cdc2}$激酶，由$p34^{cdc2}$（或$p34^{cdc28}$）蛋白和周期蛋白B结合而成。$p34^{cdc2}$蛋白在细胞周期中的含量相对稳定，而周期蛋白B的含量则呈现周期性变化。$p34^{cdc2}$蛋白只有与周期蛋白B结合后才有可能表现出激酶活性。因而，CDK1激酶活性首先依赖于周期蛋白B含量的积累。周期蛋白B一般在G_1期的晚期开始合成，通过S期，其含量不断增加，到达G_2期，其含量达到最大值。随周期蛋白B含量达到一定程度，CDK1激酶活性开始出现。到G_2期晚期阶段，CDK1活性达到最大值并一直维持到M期的中期阶段。CDK1激酶活性和周期蛋白B含量的关系见图11－36。周期蛋白A也可以与CDK1结合成复合体，表现出CDK1激酶活性。

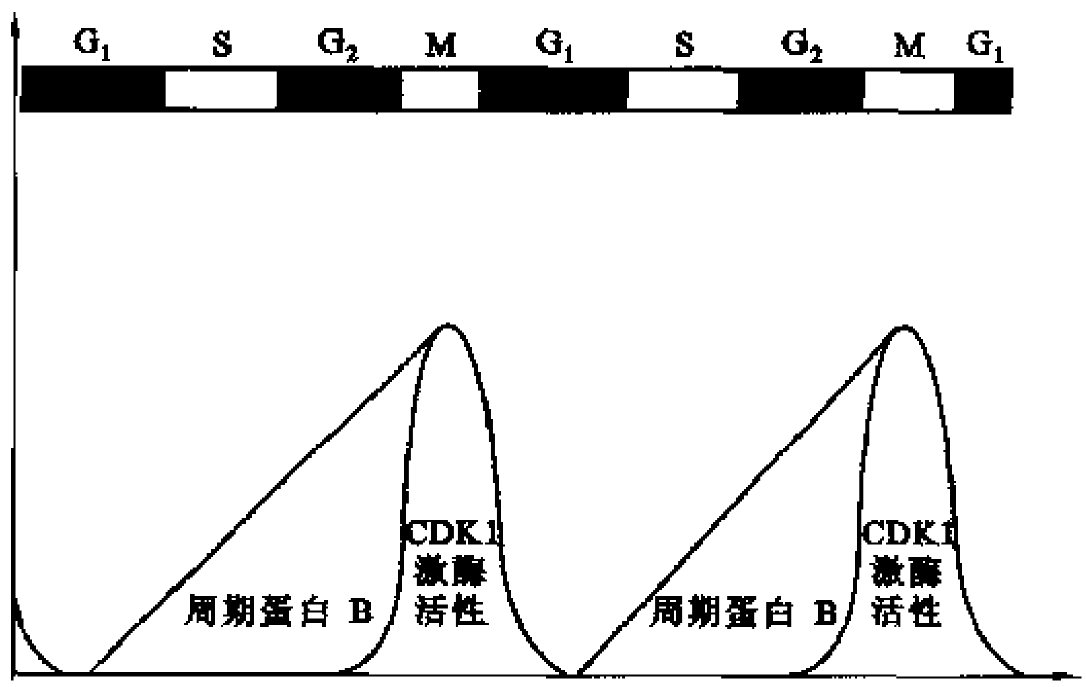


图11－36　周期蛋白B在CDK1激酶活性调节过程中的作用
CDK1激酶活性首先依赖于周期蛋白B含量的积累；周期蛋白B的含量达到一定值并与CDK1蛋白结合，同时在其他一些因素的调节下，逐渐表现出最大激酶活性

CDK1激酶通过使某些蛋白质磷酸化，改变其下游的某些蛋白质的结构和启动其功能，实现其调控细胞周期的目的。CDK1激酶催化底物磷酸化有一定的位点特异性。它一般选择底物中某个特定序列中的某个丝氨酸或苏氨酸残基。CDK1激酶可以使许多蛋白质磷酸化，其中包括组蛋白H1、核纤层蛋白A、B、C、核仁蛋白nucleolin和No.38、$p60^{c-src}$、C－abl等（见表3）。组蛋白H1磷酸化，促进染色体凝集；核纤层蛋白磷酸化，促使核纤层解聚；核仁蛋白磷酸化，促使核仁解体；$p60^{c-src}$蛋白磷酸化，促使细胞骨架重排；C－abl蛋白磷酸化，促使调整细胞形态等。

CDK激酶活性受到多种因素的综合调节。周期蛋白与CDK结合是CDK激酶活性表现的先决条件。但是，仅周期蛋白与CDK结合，并不能使CDK激

活。还需要其他几个步骤的修饰，才能表现出活性。首先，当周期蛋白与CDK结合形成复合体后，wee1/mik1激酶和CDK激酶(CDK1－activiting kinase)催化CDK第14位的苏氨酸(Thr14)、第15位的酪氨酸(Tyr15)和第161位的苏氨酸(Thr161)磷酸化。但此时的CDK仍不表现激酶活性(称为前体MPF)。然后，CDK在磷酸酶Cdc25c的催化下，其Thr14和Tyr15去磷酸化，才能表现出激酶活性。CDK1激酶活性调控见图11－37。

表11－3　某些CDK1底物及其磷酸化后可能产生的生理效应

CDK1激酶底物	序　列	M期的可能作用
核纤层蛋白B	PLSPTR	核纤层解聚，核膜崩解
核纤层蛋白A	TLSPTR	核纤层解聚，核膜崩解
核纤层蛋白C		核纤层解聚，核膜崩解
核纤层L67(clam)	SPTR	核纤层解聚，核膜崩解
波形蛋白		分裂期中间纤维体系再调整
微管结合蛋白MAP－220	SSPGG	使其失去刺激微管装配作用
组蛋白H1		染色体凝集
$p60^{c-src}$	K/RS/TPXK	进一步磷酸化其他物质(细胞骨架重排)
No.38	QTPNK	核仁分解；抑制核糖体合成？
核仁蛋白nucleolin	TPXKK	核仁分解；抑制核糖体合成？
周期蛋白B	TPXKK	调节CDK1活性
EF－1b，EF－1r		翻译抑制
SV40T		
p53	HSTPPKKKRKV	影响其亚细胞定位
C－abl	SSSPQK	调节细胞形态
C－myb	APDTPEL，PAVSPLL	降低与DNA结合能力
Caldesmon	S/TPXK/R	降低与actin结合，从微丝上游离下来
肌球蛋白	SP/TP	抑制胞质分裂
GTP结合蛋白	ser－1，－2；Thr－9	抑制细胞内物质运输
HMG1	KIQSTPVK；RSPR	降低与DNA结合能力
	ZPSZPTPK	

* 催化位点通式：S/TPXZ，S/T：Ser/Thr；X：一种极性氨基酸残基；Z：一般为一种碱性氨基酸残基，斜体字母表示磷酸化氨基酸残基位点

(二) M期周期蛋白与分裂中期向分裂后期转化

细胞周期运转到分裂中期后，M期周期蛋白A和B将迅速降解，CDK1激酶活性丧失，上述被CDK1激酶磷酸化的蛋白质去磷酸化，细胞周期便从M期中期向后期转化。目前已经知道，周期蛋白A和B的降解是通过泛素化途径(ubiquitination pathway)来实现的。

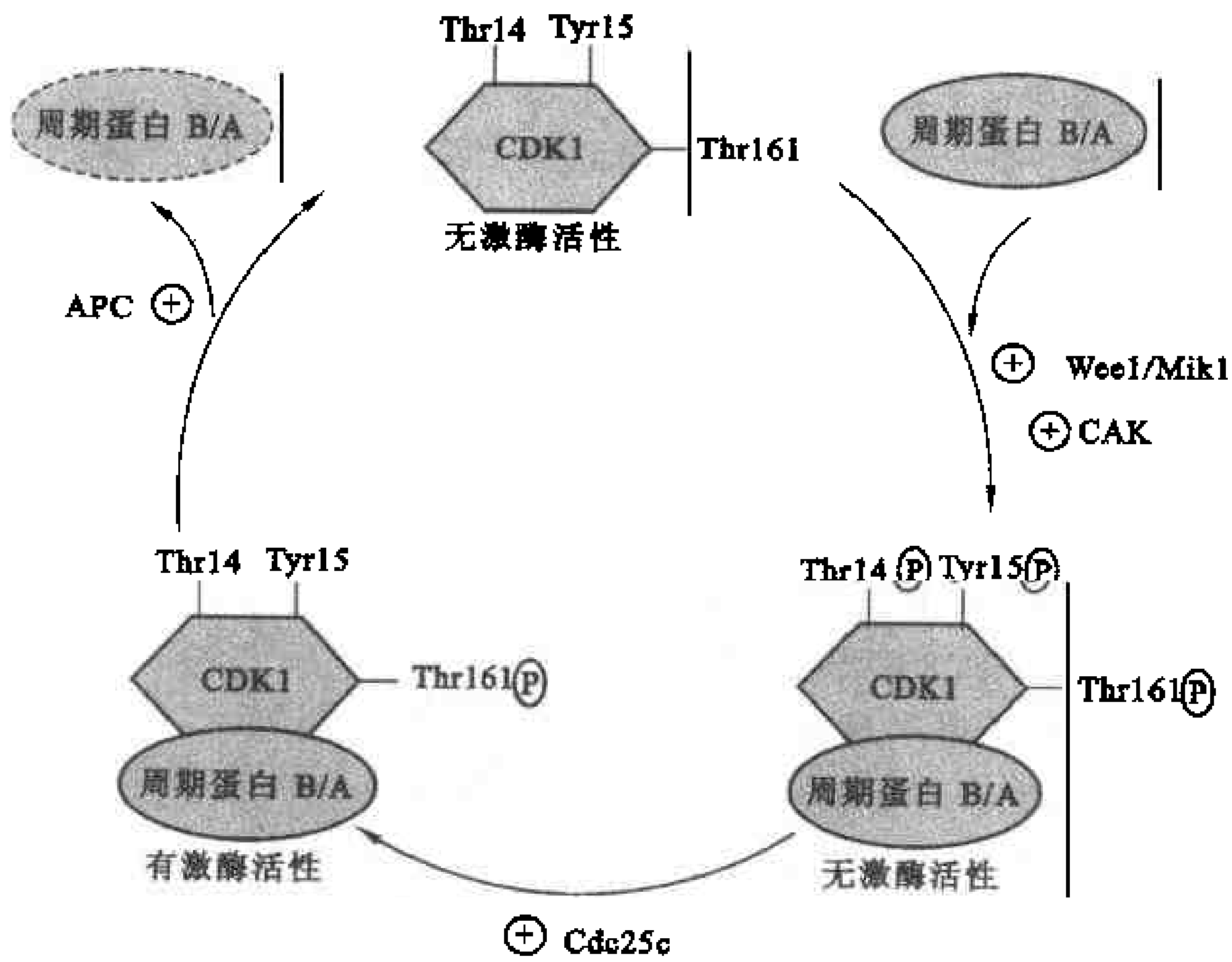


图 11－37 CDK1 激酶活性综合调控示意图

CDK 蛋白本身不具有蛋白激酶活性；当周期蛋白 B/A 含量积累到一定值时，二者相互结合成复合体，但不表现出激酶活性；在 Week/Mik1 和 CAK 激酶的催化下，CDK Thr14、Tyr15 和 Thr161 磷酸化，形成高度磷酸化的周期蛋白 CDK 复合体，但仍然不具备激酶活性；在磷酸酶 Cdc25c 的催化下，Thr14 和 Tyr15 去磷酸化，CDK 激酶活性才能够表现出来；Thr161 位点保持磷酸化状态是 CDK1 激酶活性表现所必需的；分裂中期过后，周期蛋白与 CDK 分离，在 APC 的作用下循泛素化路径降解；以虚线表示的周期蛋白为降解中的周期蛋白

在一般蛋白质降解的泛素化途径中，首先，在 ATP 供能的情况下，泛素的 C 端与非特异性泛素激活酶 E1 的半胱氨酸残基共价结合，形成 E1－泛素复合体。E1－泛素复合体再将泛素转移给另一个泛素结合酶 E2。E2 则可以直接将泛素转移到靶蛋白赖氨酸残基的 ε 氨基基团上。但是，在通常情况下，靶蛋白泛素化需要一个特异的泛素蛋白连接酶 E3。当第一个泛素分子在 E3 的催化下连接到靶蛋白上以后，另外一些泛素分子相继与前一个泛素分子的赖氨酸残基相连，逐渐形成一条多聚泛素链。然后，泛素化的靶蛋白被一个相对分子质量很大的称为蛋白酶体(proteosome)的蛋白质复合体逐步降解。多聚泛素也解聚为单个泛素分子，重新被利用(图 11－38)。M 期周期蛋白在泛素化途径裂解过程中，其分子中的破坏框起着重要的调节作用。用基因突变方法将破坏框去除，所得到的突变分子将不能被泛素化途经所降解，因而可以较长时间地保持活性。

1995 年，两个实验室率先分离并部分纯化了具有 E3 活性的蛋白质复合体。首先，Sudakin 等人在青蛙卵中分离到了一个相对分子质量 $1\ 500 \times 10^3$ 的蛋白质复合体，称为 cyclosome。在 E1、E2、泛素和 ATP 再生体系存在的情况下，cyclosome可以在体外将周期蛋白A和B通过泛素化途径降解。几乎与此同时，

King等人在非洲爪蟾卵中分离到了一个20*S*的蛋白质复合体，称为后期促进因子，也支持周期蛋白B通过泛素化途径体外降解。此后证明，cyclosome和后期促进因子为同源物，而"后期促进因子"这一名词则更广为应用，其简称为"APC"。APC的发现是细胞周期研究领域中又一大进展，表明分裂中期向后期转化也受到精密调控。进一步研究证明，APC至少有8种成分组成，分别称为APC1至APC8。蛋白质种类鉴定工作已经证明，8种成分中有4种分别为Cdc16、Cdc23、Cdc27以及BimE。而APC2、APC4、APC5和APC8 4种成分仍待进一步证明。Tugendreich等人(1995)克隆了人类的*cdc16*和*cdc27*基因，并证明Cdc16Hs和Cdc27Hs蛋白位于哺乳动物细胞的中心体和纺锤体上。用抗Cdc27Hs的抗体进行显微注射，可以将细胞抑制在分裂中期。在非洲爪蟾体系中，用抗Cdc27Hs的抗体处理上述20*S*的APC，可以使APC的泛素化活性丧失。在Kim Nasmyth实验室工作的另一些科学家则在芽殖酵母细胞中证明，Cdc16和Cdc23也为周期蛋白B的降解所必需。*bimE*基因最早发现于*Aspergillus nidulans*温度敏感突变体*BimE 7*。*BimE7*细胞在正常温度下可以正常生活。若放到限定温度下培养，*BimE7*基因会发生突变，引起细胞早熟性地进入分裂期。即使用药物处理，将细胞先抑制在S期，然后再放到限定温度下培养，也会引起细胞早熟性地进入分裂期。说明BimE是一种细胞分裂负调节因子。对BimE的确切作用机制，目前尚不甚清楚。APC除了调节M期周期蛋白泛素化途径降解之外，也调节其他一些与细胞周期调控有关的非周期蛋白类蛋白质的降解，如裂殖酵母中的Cut2和芽殖酵母中的Pds1p等。已知Cut2和Pds1p均为细胞由中期向后期转化过程中的负性调控因子。

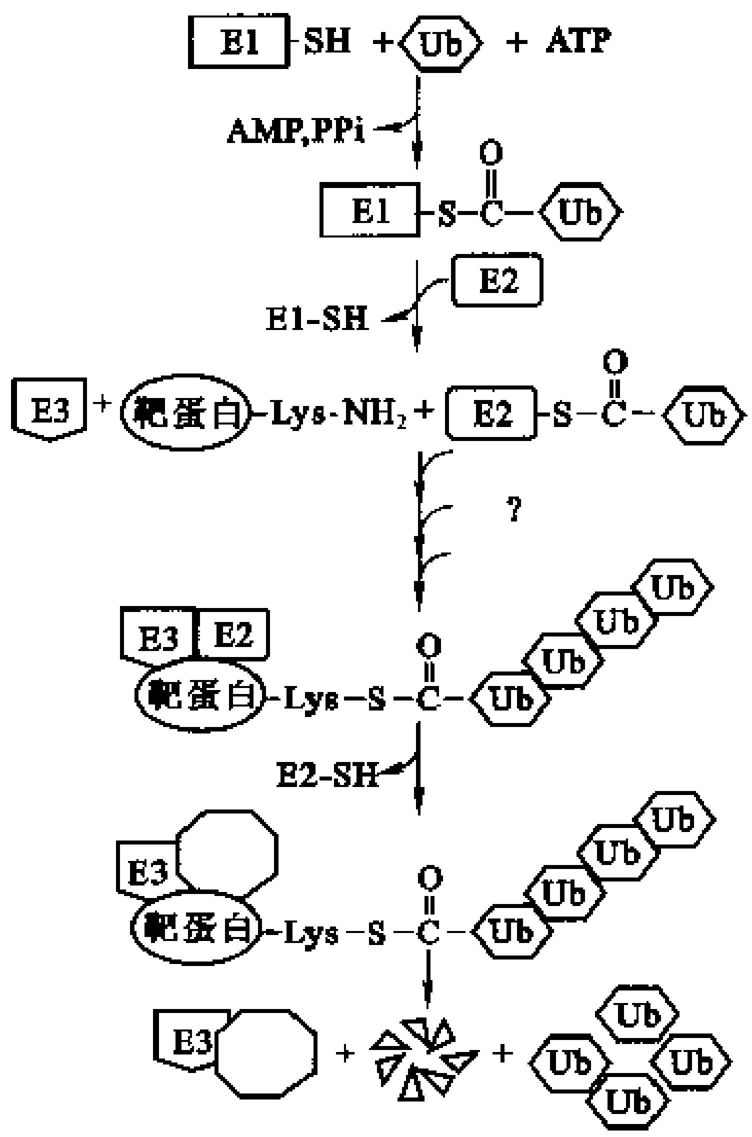


图 11-38　一般蛋白质泛素化途径裂解过程

了解APC活性变化是认识细胞周期由分裂中期向分裂后期转化的关键问题之一。APC活性也受到多种因素的综合调节。首先，已知APC各个成分在分裂间期中表达，但只有到达M期后才表现出活性，提示M期CDK激酶活性可能对APC的活性起着调节作用。实验显示，在体外，APC可以被M期CDK激酶活性所激活，且APC的多个成分被M期CDK激酶磷酸化；而活化的APC

则可以被磷酸酶作用所失活。其次发现，Cdc20 为 APC 有效的正调控因子。Cdc20 主要位于染色体动粒上，为姐妹染色单体分离所必需。APC 活性亦受到纺锤体装配检验点(spindle assembly checkpoint)的检控。纺锤体装配不完全，或所有动粒不能被动粒微管全部捕捉，APC 则不能被激活。目前已经知道，在纺锤体装配检控过程中，Mad2 蛋白起着重要作用。纺锤体装配不完全，动粒不能被动粒微管捕捉，Mad2 则不能从动粒上消失。Mad2 与 Cdc20 结合，有效地抑制 Cdc20 的活性。当纺锤体装配完成以后，动粒全部被动粒微管捕捉，Mad2 从动粒上消失，对 Cdc20 的抑制作用被解除，促使 APC 活化，降解 M 期周期蛋白，使 M 期 CDK 激酶活性丧失；在酵母细胞中，促使 Cut2/Pds1p 降解，解除其对姐妹染色单体分离的抑制，细胞则由中期向后期转化。

(三) G_1/S 期转化与 G_1 期周期蛋白依赖性 CDK 激酶

细胞由 G_1 期向 S 期转化是细胞繁殖过程中的重要生命活动之一。细胞能否成功地实现由 G_1 期向 S 期转化，标志着该细胞能否复制其 DNA 和其他与细胞分裂有关的生物大分子，进而完成细胞分裂。目前一般认为，细胞由 G_1 期向 S 期转化主要受 G_1 期周期蛋白依赖性 CDK 激酶所控制。在哺乳动物细胞中，G_1 期周期蛋白主要包括周期蛋白 D、E，或许还有 A。与 G_1 期周期蛋白结合的 CDK 激酶主要包括 CDK2、CDK4 和 CDK6 等。周期蛋白 D 主要与 CDK4 和 CDK6 结合并调节后者的活性，而周期蛋白 E 则与 CDK2 结合。周期蛋白 A 常常被划分为 M 期周期蛋白，但周期蛋白 A 也可以与 CDK2 结合而使后者表现激酶活性，提示周期蛋白 A 可能参与调控 G_1/S 期转化过程。

目前已知哺乳动物细胞中表达三种周期蛋白 D，即 D1、D2 和 D3，但三者的表达有细胞和组织特异性。据推测，在快速增殖的细胞中至少表达一种周期蛋白 D。一般情况下，一种细胞仅表达两种周期蛋白 D，即 D3 和 D1 或 D2。在细胞水平上所做的实验，包括特异的抗周期蛋白 D 的抗体显微注射和反义 RNA 显微注射等，显示周期蛋白 D 为细胞 G_1/S 转化所必需。周期蛋白 D－CDK4 和周期蛋白 D－CDK6 不能使组蛋白 H1 磷酸化。对周期蛋白 D－CDK 激酶的底物仍已知甚少，目前仅知道 Rb(retinoblastoma protein)为其底物。Rb 是 G_1/S 期转化的负性调节因子，在 G_1 期的晚期阶段通过磷酸化而失活。

周期蛋白 E 是哺乳动物细胞中表达的另一种 G_1 期周期蛋白。它在 G_1 期的晚期开始合成，并一直持续到细胞进入 S 期。当细胞进入 S 期后，周期蛋白 E 很快即被降解。周期蛋白 E 与 CDK2 结合成复合物，呈现 CDK2 激酶活性。因而，周期蛋白 E－CDK2 激酶活性峰值时间为 G_1 期晚期到 S 期的早期阶段。大量实验显示，周期蛋白 E－CDK2 激酶活性为 S 期启动所必需。在果蝇胚胎发育过程中，如果将周期蛋白 E 进行基因突变，该胚胎的细胞则被阻止在 G_1 期。将抗周期蛋白 E 的特异抗体作细胞显微注射，被注射的细胞停留在 G_1 期。用非洲爪蟾卵提取物进行细胞核重建和 DNA 复制实验，如果事先将周期蛋白 E 从卵提取物中用免疫沉淀方法去除，重建的细胞核不能复制 DNA。在哺乳动物细胞中，TGFβ 是一种生长抑制因子。有实验表明，周期蛋白 E－CDK2 激酶是

TGFβ 的主要靶物质。TGFβ 可以有效地抑制周期蛋白 E－CDK2 激酶活性，进而将细胞抑制在 G_1 期。也有一些证据显示，周期蛋白 E 在肿瘤细胞中的含量比在正常细胞中要高得多。在细胞中提高周期蛋白 E 的表达，该细胞则快速进入 S 期，而且对生长因子的依赖性降低。

实验表明，细胞周期蛋白 E－CDK2 激酶可以与类 Rb 蛋白 p107 和转录因子 E2F 结合成复合物。与 Rb 相似，p107 可以将 SAOS 细胞抑制在 G_1 期。而 E2F 则可以促进与 G_1/S 期转化和 DNA 复制有关的基因转录。一般认为，当细胞周期蛋白 E－CDK2 激酶与 p107 和 E2F 结合成复合物后，CDK2 激酶催化 p107 磷酸化，使 p107 失去抑制作用；E2F 的作用被显现出来，促进有关基因的转录，促使细胞周期由 G_1 期向 S 期转化。此外，最近有几个实验室相继证明，周期蛋白 E－CDK2 激酶直接参与了中心体复制的起始调控。

周期蛋白 A 也可以与 CDK2 结合，形成周期蛋白 A－CDK2 激酶。周期蛋白 A 的合成开始于 G_1/S 转化时期。进入 S 期后，周期蛋白 A－CDK2 激酶成为该时期主要的 CDK 激酶。目前有实验显示周期蛋白 A－CDK2 与 DNA 复制有关。在 S 期，周期蛋白 A－CDK2 复合物位于 DNA 复制中心。将抗周期蛋白 A 的抗体注射到细胞中将抑制细胞 DNA 的合成。在体外，周期蛋白 A－CDK2 激酶可以使 DNA 复制因子 RF－A 磷酸化并使后者的活性增强。此外，周期蛋白 A－CDK2 激酶也可以与 p107 和 E2F 结合成复合物，进而影响后者的功能。

到达 S 期的一定时期，G_1 期周期蛋白也是通过泛素化途径降解，但与 M 期周期蛋白的降解有所不同。G_1 期周期蛋白的降解需要 G_1 期 CDK 激酶活性的参与以及特殊的 E2 和 E3。G_1 期周期蛋白分子中不含有破坏框序列，而是含有 PEST 序列。PEST 序列对 G_1 期周期蛋白降解起促进作用。

除 G_1 期周期蛋白依赖性 CDK 激酶活性之外，细胞内还存在其他多种因素对 DNA 复制起始活动进行综合调控。首先，DNA 复制起始点的识别，是 DNA 复制调控中的重要事件之一。已经发现，从酵母细胞到高等哺乳类细胞，均存在一种称为复制起始点识别复合体(origin recognition complex，Orc)的蛋白质。Orc 含有 6 个亚单位，分别称为 Orc1、Orc2、Ocr3、Orc4、Orc5 和 Ocr6。Orc 识别 DNA 复制起始位点并与之结合，是 DNA 复制起始所必需的。其次，Cdc6 和 Cdc45 也是 DNA 复制所必需的调控因子。如果将 Cdc6 和 Cdc45 去除，DNA 便不能起始复制。Cdc6 在早 G_1 期与染色质结合，到早 S 期从染色质上游离下来。Cdc45 约在 G_1 期晚期才与染色质结合。Cdc6 对 Cdc45 与染色质结合起促进作用，但尚不知道是起直接作用还是间接作用。另外，在 20 世纪 80 年代末，人们还提出了一种“DNA 复制执照因子学说”(DNA replication-licensing factor theory)，并在此后的研究中取得突破性进展。人们早已知道，在整个细胞周期中 DNA 复制一次，而且只能一次。是什么因素控制细胞“在一个细胞周期中 DNA 复制一次，而且只能一次”呢？为此，JulianBlow 和 RonLaskey 通过实验提出，在细胞的胞质内存在一种执照因子，对细胞核染色质 DNA 复制发行“执照”(licensing)。在 M 期，细胞核膜破裂，胞质中的执照因子与染色质接触并与之结

合，使后者获得 DNA 复制所必需的执照。细胞通过 G_1 期后进入 S 期，DNA 开始复制。随 DNA 复制过程的进行，“执照”信号不断减弱直到消失。到达 G_2 期，细胞核不再含有执照信号，DNA 复制结束并不再起始。只有等到下一个 M 期，染色质再次与胞质中的执照因子接触，重新获得执照，细胞核才能开始新一轮的 DNA 复制。DNA 复制执照因子是一种什么物质呢？提纯工作发现，Mcm 蛋白（minichromosome maintenance protein）是其主要成分。Mcm 蛋白共有 6 种，分别称为 Mcm2、Mcm3、Mcm4、Mcm5、Mcm6 和 Mcm7。在细胞中去除任何一种 Mcm 蛋白，都将使细胞失去 DNA 复制起始功能。除 Mcm 蛋白之外，执照因子中还包括其他某些成分，但目前还不明了。关于 Orc、Cdc6、Cdc45 和 Mcm 蛋白在与染色质结合过程中的相互关系，见图 11－39。

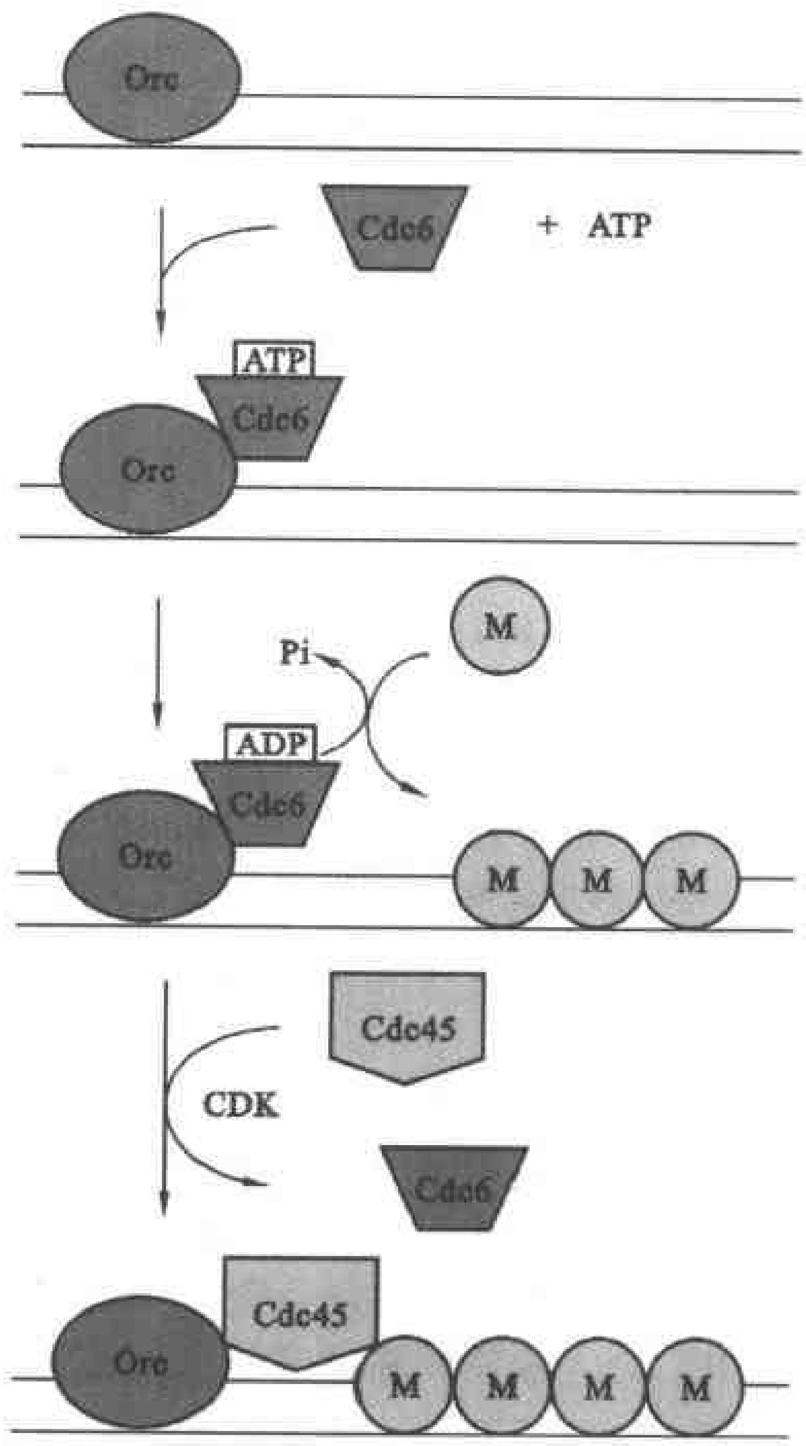


图 11－39　Orc、Cdc6、Cdc45、CDK 和 Mcm 与染色质的结合及其在 DNA 复制起始调控中的作用（M 即为 Mcm 蛋白）

(四) DNA 复制延搁检验点参与调控 $S/G_2/M$ 期转化

DNA 复制结束，细胞周期由 S 期自动转化到 G_2 期，并准备进行细胞分裂。然而，为什么在 DNA 复制尚未完成之前，细胞不能开始 $S/G_2/M$ 期转化呢？原来，细胞中存在一系列检查 DNA 复制进程的检控机制。DNA 复制不完成，细胞周期便不能向下一个阶段转化。有实验表明，当 DNA 复制尚未完成时，M 期 CDK 激酶的活性不能够表现出来。用非洲爪蟾卵提取物进一步实验发现，在 S 期，Cdc25c 的活性比较低，而 Wee1 的活性则比较高。Wee1 可以促使 CDK1 的 Thr14 和 Tyr15 磷酸化，从而抑制 CDK1 激酶活性。Cdc25c 活性低，不能有效地促使 CDK1 的 Thr14 和 Tyr15 去磷酸化，因而不能激活 CDK1。若在 S 期中加入过量的 Cdc25c，即使 DNA 复制尚未完成，也可以促使由 S 期向 G_2 和 M 期转化。提示 Wee1 和 Cdc25c 的确参与了 DNA 复制延搁检验点的调控过程。但是，目前尚不知道未复制的 DNA 是如何调控 Wee1 和 Cdc25c 活性的；也不十分清楚有多少因素参与这一调控机制。

六、其他内在和外在因素在细胞周期调控中的作用

除上述各种因素参与细胞周期调控之外，还有不少其他因素参与细胞周期调控，其中最为重要的一类因素为癌基因和抑癌基因。癌基因和抑癌基因均是细胞生命活动所必需的基因，其表达产物对细胞增殖和分化起着重要的调控作用。癌基因非正常表达可导致细胞转化，增殖过程异常，甚至癌变。目前已经分离了一百多种癌基因。其表达产物大致可归为蛋白激酶、多肽类生长因子、膜表面生长因子受体和激素受体、信号转导器、转录因子、类固醇和甲状腺激素受体、核蛋白等几个类型。它们在细胞周期调控过程中各自起着不同的作用。例如，生长因子与细胞表面的生长因子受体结合，可以促使处于生长静止状态（G_0 期）的细胞返回细胞周期，开始细胞增殖。抑癌基因表达产物对细胞增殖起负性调节作用，如 p53、Rb 等。p53 是近年来研究得较多的人类抑癌蛋白之一。*p53* 基因突变，使细胞癌变的机会大大增加，已经证实，有许多肿瘤同时伴随 *p53* 基因突变。

除细胞内在因素外，细胞和机体外界因素对细胞周期也有重要影响，如离子辐射、化学物质作用、病毒感染、温度变化、pH 变化等。离子辐射对细胞最直接的影响之一是 DNA 损伤。DNA 损伤后，细胞会很快启动其 DNA 损伤修复调控体系，抑制细胞周期运转，直到 DNA 损伤完全修复；或者最终不能完成修复，细胞走向死亡。在人类细胞 DNA 损伤修复过程中，p53 表达水平大大提高，通过一些下游调控因子，抑制 CDK1、CDK2、CDK4 等激酶活性，从而影响细胞周期运转。化学物质种类繁多，有的可直接参与调控 DNA 代谢，影响细胞周期变化；有的可以通过其他途径，影响酶类和其他调节因素的变化，改变细胞周期进程。病毒感染也是影响细胞周期进程的主要因素之一。有的病毒感染将快速抑制细胞周期，有的则可以诱导细胞转化和癌变，使整个细胞周期进程发生改变。

提　要

细胞增殖是细胞生命活动的重要特征之一。细胞增殖是生物繁殖和生长发育的基础。细胞增殖是通过细胞周期来实现的。细胞周期是细胞生命活动的全过程。细胞从一次分裂结束到下次分裂结束,即走完一个细胞周期。细胞种类繁多,各种细胞之间的细胞周期长短差别很大。同种细胞的细胞周期时间长短,也随生理活动、营养状况等变化而有所变化。细胞周期的时间长短可以通过多种方法测定。细胞周期还可以通过某些方法实现同步化。最重要的人工细胞周期同步化方法包括DNA合成阻断法和分裂中期阻断法。

真核细胞的细胞周期一般可以分为4个时期,即G_1期、S期、G_2期和M期。前三个时期合称为分裂间期,M期即分裂期。分裂间期是细胞分裂前重要的物质准备和积累阶段,分裂期即为细胞分裂实施过程。根据细胞繁殖状况,可将机体内所有细胞相对地分为三类,即周期中细胞、静止期细胞(G_0期细胞)和终末分化细胞。周期中细胞一直在进行细胞周期运转。静止期细胞为一些暂时离开细胞周期,去执行其生理功能的细胞。静止期细胞在一定因素诱导下,可以很快返回细胞周期。体外培养的细胞在营养物质短缺时,也可以进入静止期状态。终末分化细胞为那些一旦生成后终身不再分裂的细胞。

在一个细胞周期中,DNA复制一次,而且只有一次。DNA复制发生在S期。在M期,复制的DNA伴随其他相关物质,平均分配到新形成的两个子细胞中。M期也可以人为地划分为前期、前中期、中期、后期、末期和胞质分裂等几个时期。减数分裂是一种特殊的有丝分裂方式。生殖细胞在成熟过程中发生减数分裂。其特点是,DNA复制一次,然后发生两次连续的有丝分裂,导致最终生成的细胞的染色体数减半。

细胞周期运转受到细胞内外各种因素的精密调控,细胞内因是调控依据。研究发现,周期蛋白依赖性CDK激酶是细胞周期调控中的重要因素。目前已发现,在哺乳动物细胞内至少存在8种CDK激酶,即CDK1至CDK8。CDK激酶至少含有两个亚单位,即周期蛋白和CDK蛋白。周期蛋白为其调节亚单位,CDK蛋白为其催化亚单位。周期蛋白也有多种,在哺乳动物细胞中包括周期蛋白A、B、C、D、E、F、G、H等,分别与不同的CDK蛋白结合。不同的CDK激酶在细胞周期中起调节作用的时期不同。CDK激酶通过磷酸化其底物而对细胞周期进行调控。CDK激酶活性也受到其他因素的直接调节。除CDK激酶及其直接的活性调节因子外,还有不少其他因素参与细胞周期调控过程,如各种检验点等。各种检验点也有专门的调控机制。所有这些因素,可能组成一个综合的调控网络。

DNA复制起始调控是近10年细胞周期调控研究中的又一大进展。DNA复制的起始并不仅仅是在G_1期末的起始点(限止点)处才决定的。早在G_1期开始时,许多与DNA复制有关的物质即已表达并与染色质结合,开始了DNA

复制的起始调控。目前已经知道，Orc、Cdc6、Cdc45、Mcm 等蛋白参与了 DNA 复制的起始调控过程。这一调控过程也需要某些 CDK 激酶参与，尤其是周期蛋白 E－CDK2 激酶。

分裂后期促进因子 APC 的发现是细胞周期研究领域中又一重大进展。到达分裂中期后，周期蛋白 B/A 与 CDK1 分离，在 APC 介导下，通过泛素化途径而降解。CDK1 激酶活性消失，细胞由分裂中期向后期转化。APC 的成分至少含有 8 种，分别称为 APC1 至 APC8。APC 活性也受到多种因素的综合调控。其中 Cdc20 为 APC 有效的正调控因子。在分裂中期之前，位于动粒上的 Mad2 可以与 Cdc20 结合并抑制后者的活性。到分裂中期，Mad2 从动粒上消失，解除对 Cdc20 的抑制作用，促使 APC 活化。

思考题

1. 什么是细胞周期？细胞周期各时期主要变化是什么？
2. 细胞周期时间是如何测定的？
3. 细胞周期同步化有哪些方法？比较其优缺点。
4. 试比较有丝分裂与减数分裂的异同点。
5. 细胞通过什么机制将染色体排列到赤道板上？有何生物学意义？
6. 说明细胞分裂后期染色单体分离和向两极移动的运动机制。
7. 试述动粒的结构及机能。
8. 说明细胞分裂过程中核膜破裂和重装配的调节机制。
9. 细胞周期中有哪些主要检验点，各起何作用？
10. 举例说明 CDK 激酶在细胞周期中是如何执行调节功能的。

参考文献

1. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编．细胞生物学．第二版．北京：北京师范大学出版社，1998

2. 翟中和主编．细胞生物学．北京：高等教育出版社，1995

3. Alberts, B Bray, D Lewis, J Raff, M Roberts and K Watson J D. Molecular Biology of the Cell. 3rd Ed. NewYork: Garland Publishing Inc., 1994

4. Brinkley B R, Ouspenski I, Zinkowski R P. Structure and molecular onganization of the centromere-kinetochore complex. Trends Cell Biol, 1992(2): 15～21

5. Cooper G M. The Cell: A molecular Approach. Washington D C: ASM Press, 1997

6. DeRobertis and De Robertis. Cell and Molecular Biology. 7thEd. Philadelphia: Saunders College, 1980

7. Donaldson A, Blow J J. The regulation origin activation. Curr Opin in Gen&Dev, 1999 (9): 62～68

8. Elledge S J. Mitotic Arrest: Mad2 provents Sleepy from waking up the APC. Science, 1998(279): 999～1000

9. Hutchison C J, Glover D D. Cell Cycle Control. IRL Oxford Univerisity Press, 1995

10. Kastan M B. Check point Controls and Cancer. Series Editor: J Tooze. Cancer Surveys, 1997.29

11. Lew D J and Reed S I. A proliferation of cyclins. Trends in Cell Biology, 1992(2):77～81

12. Lodish, H Baltimore, D Berk, A Zipursky, S L Matsudaira, P Darnell J. Molecular Cell Biology. Third Edition. Scientific American Books Inc., 1995

13. Mimura, SandTakisawa H. Xenopus Cdc45 – dependent loading of polymerase α onto chromatin under the control of S – phase CDK. EMBOJ, 1998(17):5699～5707

14. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. Biochem J, 1995 (308):697～711

15. Wolfe S L. Molecular and Cellular Biology. California: Wadsworth Publishing Company, Belmont, 1993

第十二章

细胞分化与基因表达调控

多细胞有机体是由各种不同类型的细胞组成的(表 12－1),而这些细胞又都是由一个受精卵细胞经增殖分裂和细胞分化衍生而来的后裔。在个体发育中,由一种相同的细胞类型经细胞分裂后逐渐在形态、结构和功能上形成稳定性差异,产生不同的细胞类群的过程称为细胞分化(cell differentiation)。细胞分化是多细胞有机体发育的基础与核心,细胞分化的关键在于特异性蛋白质的合成,而特异性蛋白质合成的实质在于基因选择性表达。正因为如此,本章的主题才定为细胞分化与基因表达调控。

表 12－1　几种生物的细胞数目与类型

物　　种	细　胞　数	细胞类型
团　藻	10^2	2
海　绵	10^3	5～10
水　螅	10^5	10～20
涡　虫	10^9	100
人	10^{14}	＞200

在个体正常发育过程中,通过有控制的细胞分裂而增加细胞数目,通过有序的细胞分化而增加细胞类型,进而由不同类型的细胞构成生物体的组织与器官,执行不同的功能。显然,细胞分化为某种细胞类群通过相互协同作用完成各种复杂特殊的生物学功能,为生命向更高层次的发展与进化奠定了基础。尽管分化的细胞类型千差万别,但究其本质却是基因组保持相同而表达的基因有所不同,从而在形态结构、生理功能及生物学行为方面均有所不同。细胞分化过程常常伴随着细胞增殖与细胞凋亡,分化细胞的最终归宿往往是细胞的衰老和死亡。

细胞癌变是细胞分化领域中的一个特殊问题,因为肿瘤细胞可以看做是正常细胞分化机制失控的细胞,成为不衰老的永生细胞,丧失分化细胞的正常生理功能,形态上趋于一致,表现出某些未分化细胞的特征(有人称之为"去分化")。然而肿瘤细胞的基因组却不同程度地发生了改变,其结果是正常机体的构建受到破坏,并丧失了相应的正常生物学功能。

第一节 细胞分化

一、细胞分化的基本概念

(一) 细胞分化是基因选择性表达的结果

早期人们推测细胞分化是由于细胞在发育过程中遗传物质的选择性丢失所致，现代分子生物学的证据表明，细胞分化是由于基因选择性的表达各自特有的专一性蛋白质而导致细胞形态、结构与功能的差异。如鸡的输卵管细胞合成卵清蛋白，成红细胞合成 β 珠蛋白，胰岛细胞合成胰岛素，这些细胞都是在个体发育过程中逐渐产生的。用编码上述三种蛋白的基因分别作探针，对三种细胞中提取的总 DNA 的限制性酶切片段进行 Southern 杂交实验。结果显示，上述三种细胞的基因组 DNA 中均存在卵清蛋白基因、β 珠蛋白基因和胰岛素基因(表 12－2)；然而用同样的三种基因片段作探针，对上述三种细胞中提取的总 RNA 进行 Northern 杂交实验，结果表明，仅在输卵管细胞中表达卵清蛋白 mRNA，而成红细胞中表达 β 珠蛋白 mRNA，胰岛细胞中表达胰岛素 mRNA(表 12－2)。

表 12－2 分子杂交技术检测基因及其表达

	细胞总 DNA			细胞总 RNA		
	输卵管细胞	成红细胞	胰岛细胞	输卵管细胞	成红细胞	胰岛细胞
卵清蛋白基因	+	+	+	+	−	
β 珠蛋白基因	+	+	+	−	+	−
胰岛素基因	+	+	+	−	−	+
实验方法	Southern 杂交			Northern 杂交		

* + 阳性结果；－ 阴性结果

上述结果说明，不同类型的细胞在发育过程中表达一套特异的基因，其产物不仅决定细胞的形态结构，而且执行各自的生理功能。

(二) 组织特异性基因与管家基因

细胞分化是通过严格而精密调控的基因表达实现的。分化细胞基因组中所表达的基因大致可分为两种基本类型：一类是管家基因(house-keeping genes)；另一类称为组织特异性基因(tissue-specific genes)，或称奢侈基因(luxury genes)。管家基因是指所有细胞中均要表达的一类基因，其产物是对维持细胞基本生命活动所必需的。如微管蛋白基因、糖酵解酶系基因与核糖体蛋白基因等。而组织特异性基因是指不同的细胞类型进行特异性表达的基因，其产物赋予各种类型细胞特异的形态结构特征与特异的生理功能。如卵清蛋白基因、上皮细胞的角质蛋白基因和胰岛素基因等。

此外，有人还进一步分出一类调节基因(regulatory gene)，其产物用于调节组织特异性基因的表达，或者起激活作用，或者起阻抑作用。

因此，细胞分化的实质是组织特异性基因在时间与空间上的差异表达(differential express)。这种差异表达不仅涉及到基因转录水平和转录后加工水平上的精确调控，而且还涉及染色体和 DNA 水平，翻译和翻译后加工与修饰水平上的复杂而严格的调控过程。

应用 mRNA 差异显示法，DNA 减法杂交和 EST 技术可在不同程度上分析分化细胞中的组织特异性基因。这方面也是后基因组学或功能基因组学研究的主要内容之一。

(三) 组合调控引发组织特异性基因的表达。

人体至少有 200 多种(有的学者认为有 500 种以上)不同类型的细胞。如果每种类型的细胞分化都需要一种基因表达调控蛋白的话，那么至少需要 200 种以上的调控蛋白，然而实际上是有限的少量调控蛋白启动为数众多的特异细胞类型的分化。其机制就是组合调控(combinational control)的方式，即每种类型的细胞分化是由多种调控蛋白共同调控完成的。这样，如果调控蛋白的数目是 n，则其调控的组合在理论上就可以启动分化的细胞类型为 2^n(图 12－1)。

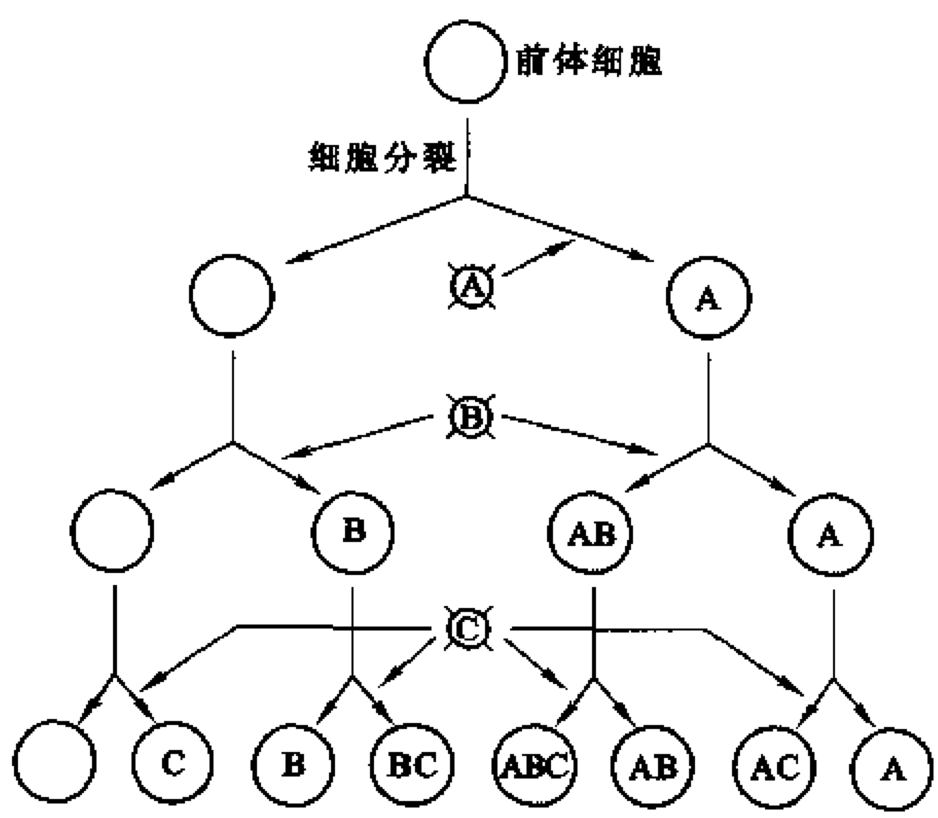


图 12－1　组合调控的作用机制示意图

A、B、C 为不同的调控蛋白

当有三种调控蛋白存在时，则不同的组合就可能启动八种不同细胞类型的分化。然而在启动细胞分化的各类调控蛋白组合中，其中往往是只有一两种调控蛋白是起决定性的因子。这样，单一调控蛋白就有可能启动整个的细胞分化过程。最明显的例子是在成肌细胞分化为骨骼肌细胞的过程中，一种关键性调控蛋白 MyoD 在体外培养的成纤维细胞中表达，结果使来自皮肤结缔组织的成

纤维细胞表现出骨骼肌细胞的特征，如表达大量的肌动蛋白和肌球蛋白并构成收缩器，在质膜上产生对神经刺激敏感的受体蛋白和离子通道蛋白，并融合成肌细胞样的多核细胞等。显然在成纤维细胞中已经具备了肌细胞特异性基因表达所需要的其他必要调控蛋白，一旦加入 MyoD 后，即形成了启动肌细胞分化的特异的调控蛋白组合。

借助于组合调控，一旦某种关键性基因调控蛋白与其他调控蛋白形成适当的调控蛋白组合，不仅可以将一种类型的细胞转化成另一种类型的细胞，而且遵循类似的机制，甚至可以诱发整个器官的形成。这一点已在研究果蝇、小鼠和人眼发育中得到证实。

在眼器官的发育中，有一种关键性调控蛋白称 Ey（果蝇）或 Pax（脊椎动物）。如将果蝇 *ey* 基因转入到早期发育中将发育成腿的细胞中表达，结果 *ey* 基因的异常表达最终诱导产生构成眼的不同类型细胞的有序三维组合，在腿的中部形成眼。显然 Ey 蛋白除了能启动细胞某些特异基因的表达，诱导某类细胞分化外，其启动的某些基因表达产物本身可能又是另一些基因的调控蛋白，它们进一步启动其他特异基因的表达，诱导分化更多的细胞类型，形成由多种不同类型细胞组成的有序三维细胞群体即导致器官形成。

这种仅靠一种关键性调控蛋白通过对其他调控蛋白的级联启动，是一种令人惊奇的高效而经济的细胞分化启动机制。复杂的有机体正是通过这一原则的重复运用逐渐完成形态建成的。

（四）单细胞有机体的细胞分化

细胞分化并非多细胞有机体独有的特征。单细胞生物甚至原核生物也存在细胞分化问题。如枯草杆菌芽孢的形成，啤酒酵母单倍体孢子的形成及萌发形成的 α 和 a 两种交配型。特别是粘菌（如盘形网柱粘菌 *Dictyostelium discoideum*）在孢子形成过程中，由单细胞变形体形成的蛞蝓形假原质团（pseudoplasmodium），并进一步分化成为柄和孢子的过程，均涉及一系列特异基因的表达。这也是研究低等生物体细胞分化很好的材料。然而与多细胞有机体细胞分化的不同之处是：前者多为适应不同的生活环境，而后者则通过细胞分化构建执行不同功能的组织与器官。因此，多细胞有机体在其分化程序与调节机制方面显得更为复杂。

（五）转分化与再生

一种类型的分化细胞转变成另一种类型的分化细胞的现象称转分化（transdifferentiation），如水母横纹肌细胞经转分化可形成神经细胞、平滑肌细胞、上皮细胞，甚至可形成刺细胞。分化程度低的神经干细胞也可形成骨髓细胞和淋巴样细胞。

转分化往往经历去分化（dedifferentiation）和再分化（redifferentiation）的过程。去分化又称脱分化，是指分化细胞失去其特有的结构与功能变成具有未分化细胞特征的过程。植物的体细胞在一定条件下形成未分化细胞群的细胞团——愈伤组织，即为去分化现象。愈伤组织可进一步诱导其再分化形成根和

芽的顶端分生组织的细胞，并最终长成植株。

生物界普遍存在再生现象(regeneration)，广义的再生可包括分子水平、细胞水平、组织与器官水平及整体水平的再生。但一般再生是指生物体缺失一部分后发生重建的过程，如幼体蝾螈肢体切除后，伤口处部分细胞凋亡，多数细胞(包括皮肤、肌肉、软骨和其他结缔组织的细胞)经去分化形成间充质或纤维细胞样的细胞团——再生芽基(regeneration blastema)，芽基细胞再分化形成以有序方式排列的从肱骨直至指骨的完整肢体，这一过程显然由同源异型基因的表达模式所调控。

另一典型的例子是沃尔夫晶体的再生(Wolftian lens regeneration)，若将发育中的蝾螈晶状体摘除，其背面的虹膜上含黑色素的平滑肌细胞就会去分化，失去黑色素和肌纤维，然后再分化或转分化成为产生晶状体蛋白的晶状体细胞。

不同的多细胞有机体，其再生能力有明显的差异，一般来说，植物比动物再生能力强，低等动物比高等动物再生能力强。从水螅中部切下仅占体长5%的部分，便可长成完整的水螅；而两栖类却只能再生形成断肢；人和其他高等动物只具有组织水平(除肝脏外)的再生能力。再生能力通常随个体年龄增大而下降。

再生现象又从另一个侧面反映了细胞的全能性。在不同物种中，细胞分化状态的可塑性有很大不同。DNA的复制有利于重新编程和获得新的分化状态。当然，在再生过程中，有些细胞并不涉及转分化，如肝细胞只是从 G_0 期进入细胞周期。此外，再生过程也不能完全排除储备的多能干细胞的参与。

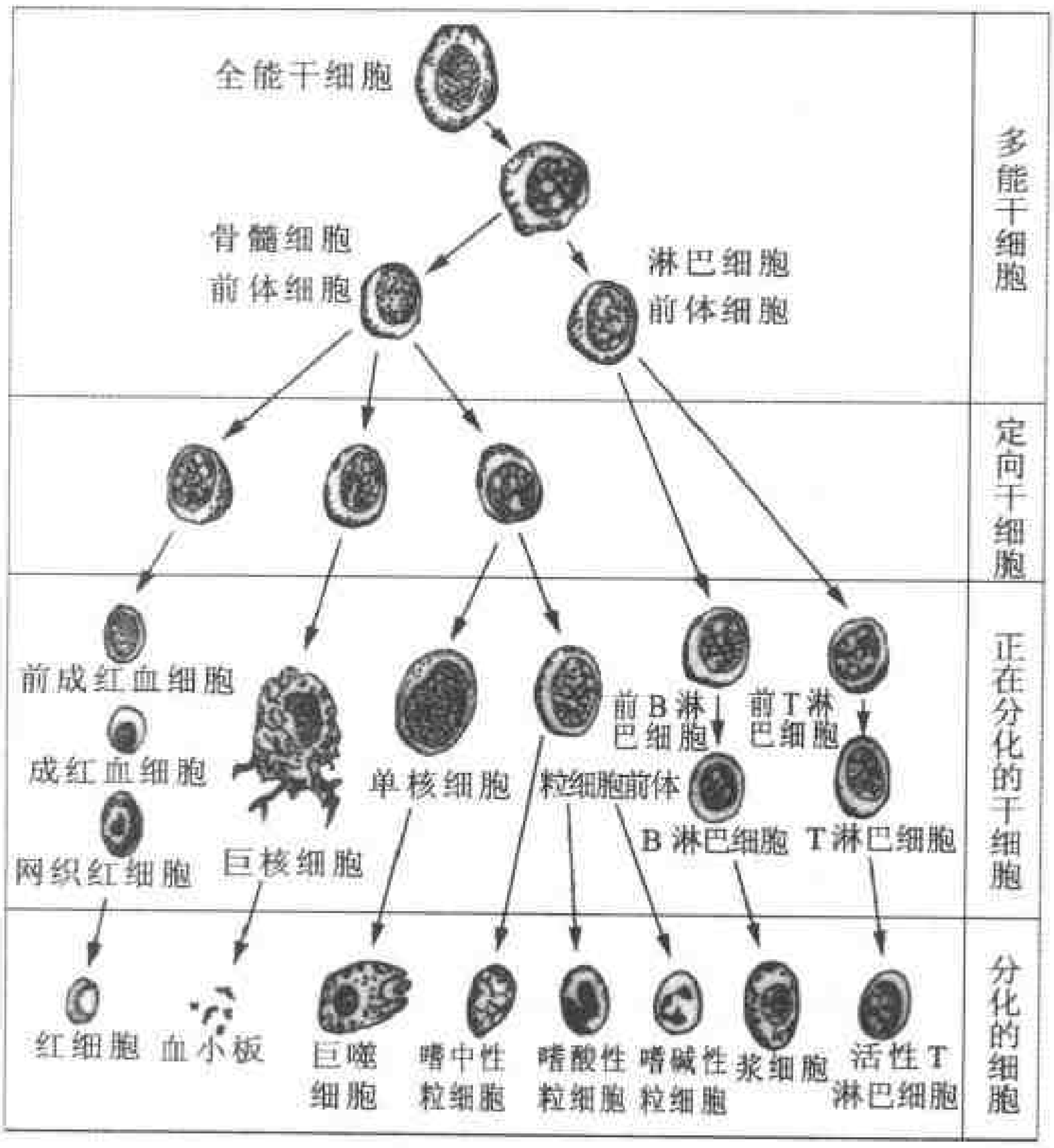
二、影响细胞分化的因素

通过组合调控的方式启动组织特异性基因的表达是细胞分化的基本机制。因此有必要从细胞的基因组入手来了解与分析影响细胞分化的因素。

(一) 细胞的全能性

细胞全能性(totipotency)是指细胞经分裂和分化后仍具有产生完整有机体的潜能或特性，称为细胞的全能性。受精卵及早期的胚胎细胞都是具有全能性的细胞。植物的体细胞在适宜的条件下可培育成正常的植株，这不仅是细胞全能性的有力证据，而且也广泛地应用在植物基因工程的实践中。

然而对动物细胞特别是高等动物细胞随着胚胎的发育，细胞逐渐丧失了发育成个体的能力，仅具有分化成有限细胞类型及构建组织的潜能，这种潜能称为多潜能性(pluripotency)。具有多潜能性的细胞称为干细胞(stem cell)，如小鼠胚胎发育的囊胚期的原始内层细胞称为胚胎干细胞(embryo stem cell)；成体中具有分化成多种血细胞能力的细胞称多能造血干细胞(图12-2)，它在造血器官骨髓中仅占细胞数的万分之一；仅具有分化形成某一种类型能力的细胞，称为单能干细胞(monopotential cell)或称定向干细胞(directional stem cell)。由定向干细胞最终形成特化细胞类型的过程称为终末分化(terminal differentiation)。



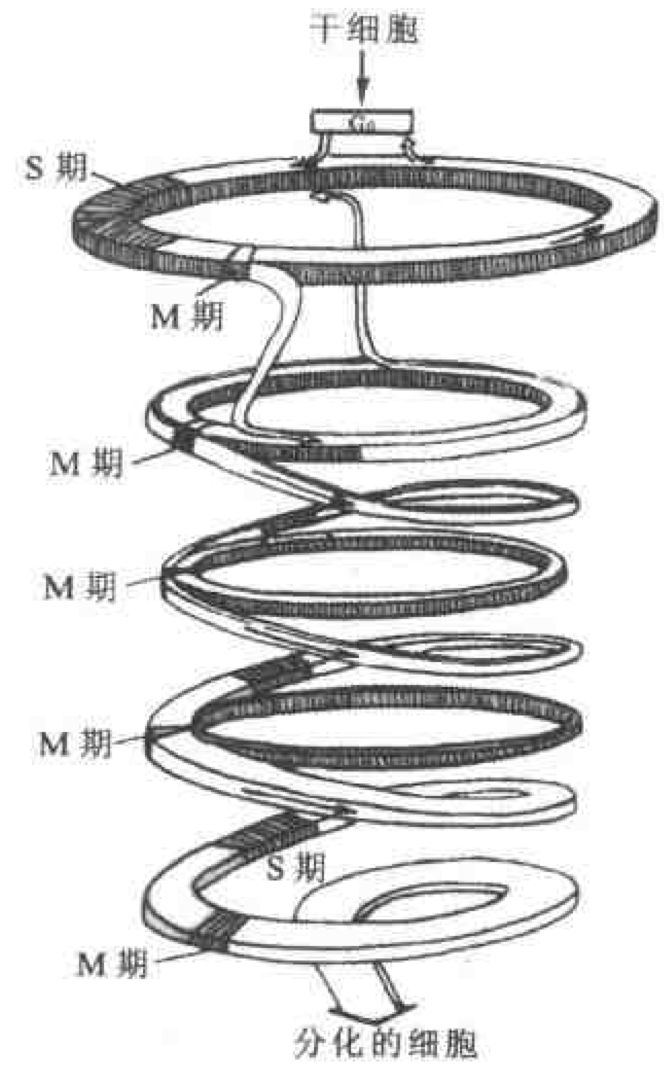


图 12-2 细胞分化模式图

A:血细胞及淋巴细胞分化;B:干细胞分化

一般情况下,在整个发育过程中,细胞分化潜能逐渐受到限制而变窄,即由全能性细胞转化为多能和单能干细胞。但是对于细胞核而言,却始终保持其分化的全能性。早期利用两栖类动物进行核移植试验证明,将蛙的囊胚期细胞甚至蝌蚪的已经分化为肠上皮细胞的细胞核植入去核的卵子中,则可发育成蝌蚪甚至成蛙。随后,类似的实验在小鼠中也获得成功。这样用有限分化细胞的细胞核进行移植实验,证明了细胞核的全能性。显示出在分化过程中,绝大多数细胞均保持其完整的基因组或染色体组不变。

1997 年将羊的乳腺细胞的细胞核植入去核的羊卵子中,成功地克隆了多莉羊,进一步证明了即使是终末分化的细胞,其细胞核也具有全能性。然而与植物细胞不同,高等动物的体细胞至今仍不能形成一个完整的个体,它不仅显示高等动物细胞分化的复杂性,而且也说明卵细胞的细胞质对细胞分化的重要作用。

近年来,在体外由胚胎干细胞诱导分化成造血细胞、神经细胞、肌肉细胞以及神经干细胞可诱导分化成各种血细胞等一系列的研究结果,不仅加深了对细胞全能性和细胞分化机制的了解,而且在细胞治疗及用于组织与器官移植的组织工程(tissue engineering)的研究与实践中都具有重要意义。

(二)影响细胞分化的因素

细胞中组织特异性基因的选择性表达主要是由调控蛋白所启动。调控蛋白

的组合是影响细胞分化的主要的直接因素。一般来说，这种影响主要受胞外信号系统的调控，而胞外信号甚至细胞微环境的调控又是通过细胞自身的因素如胞内因素、细胞位置等起作用的。在很多物种中影响细胞分化的胞内因素可以追溯到单细胞受精卵中细胞质的作用。此外，外部的环境对某些物种细胞分化乃至个体发育也会产生很大的影响。

1. 胞外信号分子对细胞分化的影响

在研究早期胚胎发育过程中发现，一部分细胞会影响周围细胞使其向一定方向分化，这种作用称近端组织的相互作用（promixate tissue interaction），也称为胚胎诱导。其中一个典型的例证就是在眼的发生中本身的逐级诱导过程。正常情况下，早期的视泡诱导与之接触的外胚层上皮细胞发育成晶状体，随后在视泡和晶状体的共同诱导下外面的表皮细胞形成角膜。如果把早期的视泡移植在头部的其他部位，同样可诱导与之接触的外胚层发育成晶状体。

近端组织的相互作用是通过细胞旁分泌产生的信号分子旁泌素（又称细胞生长分化因子）来实现的。已知它包括成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）、转化生长因子（transforming growth factor，TGF）以及 hedgehog 家族、Wnt 家族和 Juxtacrine 等五大家族因子。与激素一样，它们都是影响细胞分化的重要的信号分子。

另一种远距离细胞间相互作用对细胞分化的影响主要是通过激素来调节的。如无尾两栖类的蝌蚪变态过程中，尾部退化及前后肢形成等变化是由甲状腺分泌的甲状腺素和三碘甲状腺氨基酸的分泌增加所致。昆虫变态过程主要是由 20－羟蜕皮素和保幼素共同调控的。人体血细胞定向分化也受到多种细胞因子的调控。

2. 细胞记忆与决定

信号分子的有效作用时间是短暂的，然而细胞可以将这种短暂的作用储存起来并形成长时间的记忆，逐渐向特定方向分化。果蝇的成虫盘（imaginal disc）是一些初级分化的细胞群，而在幼虫变态过程中，不同的成虫盘发育为成虫不同的器官，如腿、翅和触角等。人们曾把果蝇的变态前幼虫的成虫盘细胞植入成虫体内，连续移植 9 年，细胞增殖多达 1 800 代，然后将这种成虫盘细胞再移植回幼虫体内则依然没有失去记忆，照例发育成为相应的器官。

早期的研究提出“决定早于分化”这一概念，所谓决定（determination）是指一个细胞接受了某种指令，在发育中这一细胞及其子代细胞将区别于其他细胞而分化成某种特定的细胞类型，或者说在形态、结构与功能等分化特征尚未显现之前就已确定了细胞的分化命运。

细胞的决定与细胞的记忆有关，而细胞记忆可能通过二种方式实现：一是正反馈途径（positive feedback loop），即细胞接受信号刺激后，活化转录调节因子，该因子不仅诱导自身基因的表达，还诱导其他组织特异性基因的表达；二是染色体结构变化（DNA 与蛋白相互作用）的信息传到子代细胞，如同两条 X 染色体中，其中一条始终保持凝集失活状态并可在细胞世代间稳定遗传一样。当然这

些可能的记忆机制也可以用来解释某些能够继续增殖的终端分化细胞，如平滑肌细胞和肝细胞分裂后只能产生与亲代相同的细胞类型。

3．受精卵细胞质的不均一性对细胞分化的影响

由于细胞具有记忆能力，随着分化信息不断地积累使之成为“决定”了的细胞，这种与细胞分化相关的信息在很多动物中可以上溯至受精卵。在卵母细胞的细胞质中除了储存有营养物质和多种蛋白外，还含有多种 mRNA，其中多数 mRNA 与蛋白质结合处于非活性状态，成为隐蔽 mRNA，不能被核糖体识别。然而它们在卵细胞质中呈不均匀地分布，特别是某些动物如柄海鞘、两栖动物等，在受精后卵细胞质重新定位，少数母体 mRNA 被激活，合成早期胚胎发育所需要的蛋白质。随着受精卵早期细胞分裂，隐蔽 mRNA 不均一地分配到子细胞中。通过对角贝和海胆受精卵发育的研究证明，在卵裂过程中不同的细胞质分配到不同的子细胞中，从而将决定未来细胞分化的命运，产生分化方向的差异。根据这一现象，人们提出了决定子（determinant）的概念，即指影响卵裂细胞向不同方向分化的细胞质成分。通过对果蝇生殖细胞和体细胞分化过程的比较研究，证明了果蝇卵细胞后端存在决定生殖细胞分化的细胞质成分即生殖质（germ plasm），它是种质细胞的决定子，这一现象普遍存在于动物界。

显然决定细胞向某一方向分化的初始信息储存于卵细胞中，在很多物种中，卵裂后的细胞所携带的信息已开始有所不同，这种区别又通过信号分子影响其他细胞产生级联效应。这样最初储存的信息不断被修饰并逐渐形成更为精细更为复杂的指令，最终产生分化各异的细胞类型。

4．细胞间的相互作用与位置效应

在胚胎学研究中，人们已注意到细胞间的相互作用对细胞分化与器官构建的影响，并称这种作用为胚胎诱导（embryonic induction）。胚胎诱导作用不断强化并可分成不同的层次，虽然人们对胚胎诱导作用的机制还不清楚，但包括旁泌素等信号分子的作用显然是其重要原因之一。

细胞所处的位置不同对细胞分化的命运也有明显的影响。实验证明，改变细胞所处的位置可导致细胞分化方向的改变，这种现象称位置效应（position effect）。“位置信息”是产生效应的主要原因。如在鸡胚发育的原肠胚期，在由脊索细胞分泌的由 Sonic hedgehog 的基因编码的信号蛋白的作用下，靠近脊索的细胞分化形成底板（floor plate），而远离脊索的细胞分化成运动神经元，如将另一个脊索植入鸡胚中线一侧，则会以同样方式诱导底板和运动神经元的发育。

如果 Sonic hedgehog 的基因发生突变，则会导致中枢神经系统发育异常，甚至可出现面部仅有一眼和一个鼻孔的畸胎。同样，Sonic hedgehog 蛋白也通过位置效应调节肢体的发育，趾的长度、形态和内部结构，均受控于细胞与这一蛋白信号分子源的距离，即取决于 Sonic hedgehog 蛋白的浓度或某些由它调控的其他因子的浓度赋予肢芽分化的位置信息，最终发育形成由骨、软骨和皮肤等构成的不同的趾。

5．环境对性别决定的影响

性别决定是细胞分化和生物个体发育研究领域的重要课题之一。环境对性别决定的影响早已被人们发现和研究。其中典型的例子是许多爬行动物，如蜥蜴类的 *A. agama*，*E. macularius*，它们在较低温度条件下(24℃)全部发育为雌性，而温度提高(32℃)则全部发育为雄性。龟类的 *T. graetta*，*C. caretta* 又出现相反的情况，即在较低温度条件下全部发育为雄性，而温度提高则全部发育为雌性。另外，有一种蜗牛类的软体动物 *Crepidula*，它们的性别决定取决于个体间的相互位置关系，在它们形成的上下相互叠压的群体中，位于下方的个体发育为雌性，而位于上方的个体发育为雄性。人们对于环境影响性别的机制还不清楚，但是它无疑表明，生物的个体发育和细胞的分化具有对环境的容纳性。

环境因素对细胞分化可产生影响，并进而影响到生物的个体发育。但是，这些影响因素又都是通过细胞自身的遗传机构发挥作用的。因此总的来说，个体发育中的细胞分化的基础是建立在细胞的内部，而环境因素只是条件。

6. 染色质变化与基因重排对细胞分化的影响

一百多年前人们就发现仅有 1 对或 2 对染色体的马蛔虫在卵裂过程中，染色体出现消减现象，追踪至 32 个细胞的分裂球阶段，发现除一个细胞保留正常的染色体外(将分化成生殖细胞)，其余将分化成体细胞的细胞中，全部出现染色体丢失，显然这是细胞分化的一个特例。但在当时成为种子学说的重要依据。

人们还发现纤毛虫营养核中染色体 DNA 大量缺失的现象。原生动物纤毛虫类(如草履虫、四膜虫)的细胞内存在二个细胞核，小核称为生殖核，包含完整的基因组；大核称为营养核，丢失 10%～90%的 DNA，剩余的 DNA 经重排与扩增后形成多倍体，其基因活跃地转录并决定一切表型特征。大核是在有性生殖过程中，由小核发育而来，细胞虽未分化但细胞核"分化"成二种不同的类型。

基因重排是细胞分化的另一种特殊方式。抗体是由浆细胞分泌的，而浆细胞是由 B 淋巴细胞分化而来。在这一过程中，B 淋巴细胞中的 DNA 经过断裂丢失与重排的复杂变化从而利用有限的免疫球蛋白基因，在理论上可表达出数百亿种抗体。

三、细胞分化与胚胎发育

细胞分化是胚胎发育的基础，这一点是毋庸置疑的，然而有限的基因(如线虫 5 000 个、果蝇 50 000 个、人 100 000 个)选择性地表达如何分化出形态、功能各异的细胞，精确地构建成各种组织、器官以及多姿多彩的生命体，如同仅 88 个键盘的钢琴却演奏出无限美妙的乐曲来，一直是人们十分关注的热点，也是生命科学中面临的最具有挑战性的问题之一。

多年来，人们曾用不同的生物模式，试图了解发育的途径，并探索其分子机制，虽然积累了丰富的资料，但却又不时陷入扑朔迷离的困惑之中。

通过对大量的果蝇突变株的研究，人们发现一套在果蝇体节发育中起关键作用的基因群，称同源异型基因(Hox genes)。因其在基因表达调控中的主导作

用又称 homeotic selector gene,亦称 Hox 基因。这些基因都含有一段高度保守的由 180 bp 组成的 DNA 序列,称同源框。同源框编码的 60 个氨基酸又称同源异型结构域,所形成的 α 螺旋－转角－α 螺旋结构可与特异 DNA 片段中的大沟相互作用启动基因的表达。

有趣的是同源异型基因在染色体上排列的次序不仅与这些基因在胚胎发育过程中活化的时间顺序是一致的,而且与它们沿躯体纵轴的空间表达时相也基本相符,如头区表达该基因簇的第一个基因,而躯体后部则表达基因簇最后一个基因。这种细胞分化调控的时间与空间上的程序浓缩在每一个细胞的染色体上。同源异型基因前后序列,是否仅仅是进化过程中的偶合,很值得探讨。

更令人惊异的是,*Hox* 基因不仅存在于果蝇中,而且存在于多种无脊椎动物和高等的脊椎动物中。果蝇中有一套 *Hox* 基因,而脊椎动物中有 4 套 *Hox* 基因,它们都具有非常保守的同源框结构。不同动物中的同源异型结构域氨基酸序列的同源性一般为 60%～80%,在某些 *Hox* 基因中,如蛙 *XlH Hox*2 基因与果蝇 *Antp* 基因的同源框所编码的 60 个氨基酸仅有一个不同。所有这些基因在细胞分化与发育中均具有类似的生物学功能。

随着细胞分化与胚胎发育机制的深入了解,有关发育各阶段的分散的局部知识,正迅速汇集到一起,各种完全不同的生物实验模式逐渐显示出其内在的共性。正如拼板玩具一样迅速地向最终图谱迈进。长期令人困惑不解的细胞分化与发育过程的奥妙之处不仅在于其过程与结果的复杂性,而且在于构建多种细胞组织及机体中难以置信的经济性。在生物长期演化过程中,很可能仅利用有限的较为简单的基因产物为工具,凭借重复而富有创造性的方式指导细胞的行为,分化并产生当今世界上多种生命体。

第二节 癌 细 胞

细胞分化的过程往往伴随细胞的分裂,即使 DNA 精确地复制与修复,其基因的碱基突变率也仅能达到 10^{-6},从进化的角度看突变是选择的源泉,具有积极的意义。但如果在人的一生中,体细胞要分裂 10^{16}次,那么推断在基因组中每个基因都可能发生突变。基因突变的结果有可能招致某些分化细胞的生长与分裂失控,脱离了衰老和死亡的正常途径而成为癌细胞(cancer cell)。细胞通过分裂与分化过程,形成不同的细胞类型并由此构建有机体的组织和器官。而癌细胞的细胞类型趋于一致,破坏有机体的组织器官。癌细胞与正常分化细胞不同的一点是,不同类型的分化细胞都具有相同的基因组;而癌细胞的细胞类型与特征相近,但基因组却发生不同形式的突变。随着环境因素的影响,基因突变率提高,细胞癌变的几率也随之增加。因此,对癌细胞形成与特征的了解不仅有助于了解细胞增殖、分化与死亡的调节机制的细节,而且也为彻底治疗癌症——这一维护人类健康所面临的十分严峻的问题提供线索和希望。

一、癌细胞的基本特征

动物体内细胞分裂调节失控而无限增殖的细胞称为肿瘤细胞(tumor cell)。具有转移能力的肿瘤称为恶性肿瘤(malignancy),上皮组织的恶性肿瘤称为癌。目前癌细胞已作为恶性肿瘤细胞的通用名称。其主要特征是:

1. 细胞生长与分裂失去控制

在正常机体中细胞或处于生长与分裂状态,或处于静止状态,执行其特定的生理功能(如肝细胞和神经细胞)。在成体的一些组织中,会有新生细胞的增殖,衰老细胞的死亡,在动态平衡中维持组织与器官的稳定,这是一种严格受控的过程。而癌细胞失去控制,成为"不死"的永生细胞,核质比例增大,分裂速度加快,结果破坏了正常组织的结构与功能。

2. 具有侵润性和扩散性

动物体内特别是衰老的动物体内常常出现肿瘤,这些肿瘤细胞仅位于某些组织特定部位,称之为良性肿瘤,如疣和息肉。如果肿瘤细胞具有浸润性和扩散性,则称之为恶性肿瘤,即癌症发生。

良性肿瘤与恶性肿瘤细胞的最主要区别是:恶性肿瘤细胞(癌细胞)的细胞间粘着性下降,具有浸润性和扩散性,易于浸润周围健康组织,或通过血液循环或通过淋巴途径转移并在其他部位粘着和增殖。经转移并在身体其他部位增殖产生的次级肿瘤称为转移灶(metastasis)。这是癌细胞的基本特征。此外,在分化程度上癌细胞低于良性肿瘤细胞,且失去了许多原组织细胞的结构和功能。

3. 细胞间相互作用改变

正常细胞之间的识别主要是通过细胞表面特异性蛋白的相互作用实现的,进而形成特定的组织与器官。癌细胞冲破了细胞识别作用的束缚,在转移过程中,除了要产生水解酶类(如用于水解基底膜成分的酶类),而且要异常表达某些膜受体蛋白,以便与别处细胞粘着并生长。同时借此逃避免疫监视作用,防止天然杀伤细胞等的识别和攻击。

4. 蛋白表达谱系或蛋白活性改变

癌细胞的蛋白表达谱系中,往往出现一些在胚胎细胞中所表达的蛋白,如在肝癌细胞中表达胚肝细胞中的多种蛋白 。多数癌细胞中具有较高的端粒酶活性。此外癌细胞还异常表达与其恶性增殖、扩散等过程相关的蛋白成分,如纤连蛋白减少,某些癌蛋白过度表达。

5. mRNA 转录谱系的改变

癌细胞的种种生物学特征主要归结于其基因表达及调控方向的改变。人们曾用基因表达谱分析技术(serial analysis of gene expression,SAGE)对乳腺癌和直肠癌细胞与正常细胞中基因表达谱进行了比较。在检测的 30 万个转录片段(transcripts),至少相当于 4.5 万个所表达的基因中约有 500 个转录片段(相当于 75 个基因)有明显不同,仅占整个基因表达谱中的很少一部分。

此外，由于癌细胞突变位点不同，同一种癌甚至同一癌灶中的不同癌细胞之间也可能具有不同的表型，而且其表型不稳定，特别是具有高转移潜能的癌细胞其表型更不稳定，这就决定了癌细胞异质性的特征。

6．体外培养的恶性转化细胞的特征

应用人工诱导技术可培养出恶性转化（malignant transformation）的细胞及恶性程度不同的转化细胞。恶性转化细胞同癌细胞一样具有无限增殖的潜能，在体外培养时贴壁性下降，可不依附在培养器皿壁上生长，有些还可进行悬浮式培养；正常细胞生长到彼此相互接触时，其运动和分裂活动将会停止，即所谓接触抑制（contact inhibition）。癌细胞失去运动和分裂的接触抑制，在琼脂培养基中可形成细胞克隆，这也是细胞恶性程度的标志之一。当将恶性转化细胞注入易感生物体内，往往会形成肿瘤。对体外培养的恶性转化细胞及癌细胞的比较研究有助于了解癌细胞的特征及发生机制。

二、癌基因与抑癌基因

癌症是由携带遗传信息的 DNA 的病理变化而引起的疾病。与遗传病不同，癌症主要是体细胞 DNA 突变，而不是生殖细胞 DNA 突变。

癌基因（oncogenes）是控制细胞生长和分裂的正常基因的一种突变形式，能引起正常细胞癌变。癌基因最早发现于诱发肿瘤的劳氏肉瘤病毒（Rous Sarcoma Virus，属逆转录病毒科）。它携带 *Src* 基因，该基因对病毒繁殖不是必要的，但当病毒感染鸡体后可引起细胞癌变。后来人们发现在鸡的正常细胞基因组中也有一个与病毒 *Src* 基因同源性很高的基因片段。鸡体内的 *Src* 基因编码一种与细胞分裂调控相关的蛋白激酶。它不具有致癌能力，但由于它的发现源于病毒癌基因及其与病毒癌基因的高同源性，因而不恰当地称为细胞癌基因（cellular oncogene）或原癌基因（proto－oncogene），但也以此表明该基因突变可能有致癌的危险。

对多种致癌的逆转录病毒中存在的癌基因（v－oncogene）的研究，均导致正常细胞中原癌基因的发现，其中很多原癌基因的产物都是细胞生长分裂的调控因子。反过来，在人的多种癌细胞中证实了这些基因发生了突变。

逆转录病毒所携带的癌基因可能是由于这类病毒特殊的增殖方式而从宿主细胞中捕获的，由于碱基序列的突变导致所编码的蛋白产物超活化或失去控制，最终导致肿瘤的形成。

目前已发现近百种癌基因。癌基因编码的蛋白主要包括生长因子（growth factor）、生长因子受体、信号转导通路中的分子、基因转录调节因子和细胞周期调控蛋白等几大类型（表 12－3）。当然，因突变而诱发癌症的基因还不只这些。细胞信号转导是细胞增殖与分化过程的基本调节方式，而信号转导通路中蛋白因子的突变是细胞癌变的主要原因。如人类各种癌症中约 30％的癌症是信号转导通路中的 *ras* 基因突变引起的。癌基因的产物常常是正常细胞不表达、或

表达量很少、或表达产物活性不能调控的一类蛋白。然而人们注意到，在视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)的细胞中，是由于一种称为 *Rb* 的基因突变失活，而导致肿瘤发生。随后又发现 *p53* 等基因均有类似的现象。这类基因称为抑癌基因(tumor－suppressor gene)。抑癌基因实际上是正常细胞增殖过程中的负调控因子，它编码的蛋白往往在细胞周期的检验点上起阻止周期进程的作用。如果抑癌基因突变，丧失其细胞增殖的负调控作用，则导致细胞周期失控而过度增殖。

表 12－3　癌基因的基本类型

类　型	举　例	相应原癌基因编码的蛋白
Ⅰ　生长因子	*sis*	血小板生长因子
Ⅱ　生长因子受体	*fms*	CSF－1 受体
	erbB	上皮生长因子受体
Ⅲ　胞内信号转导通路分子	*Src*	酪氨酸蛋白激酶
	mos	丝氨酸蛋白激酶
	Ras	GTP 结合蛋白
Ⅳ　转录因子	*fos*	转录因子 API
	myc	转录调节蛋白
Ⅴ　细胞周期调控蛋白	*Rb*	肿瘤抑制因子
	p53	肿瘤抑制因子

通过细胞增殖相关基因和抑制细胞增殖相关基因的协同作用，共同调控细胞的正常增殖进程。肿瘤细胞的基本特征之一是细胞增殖失控，恰恰也是这两大类基因的突变，破坏了正常细胞增殖的调控机制，形成了具有无限分裂潜能的肿瘤细胞(图 12－3)。

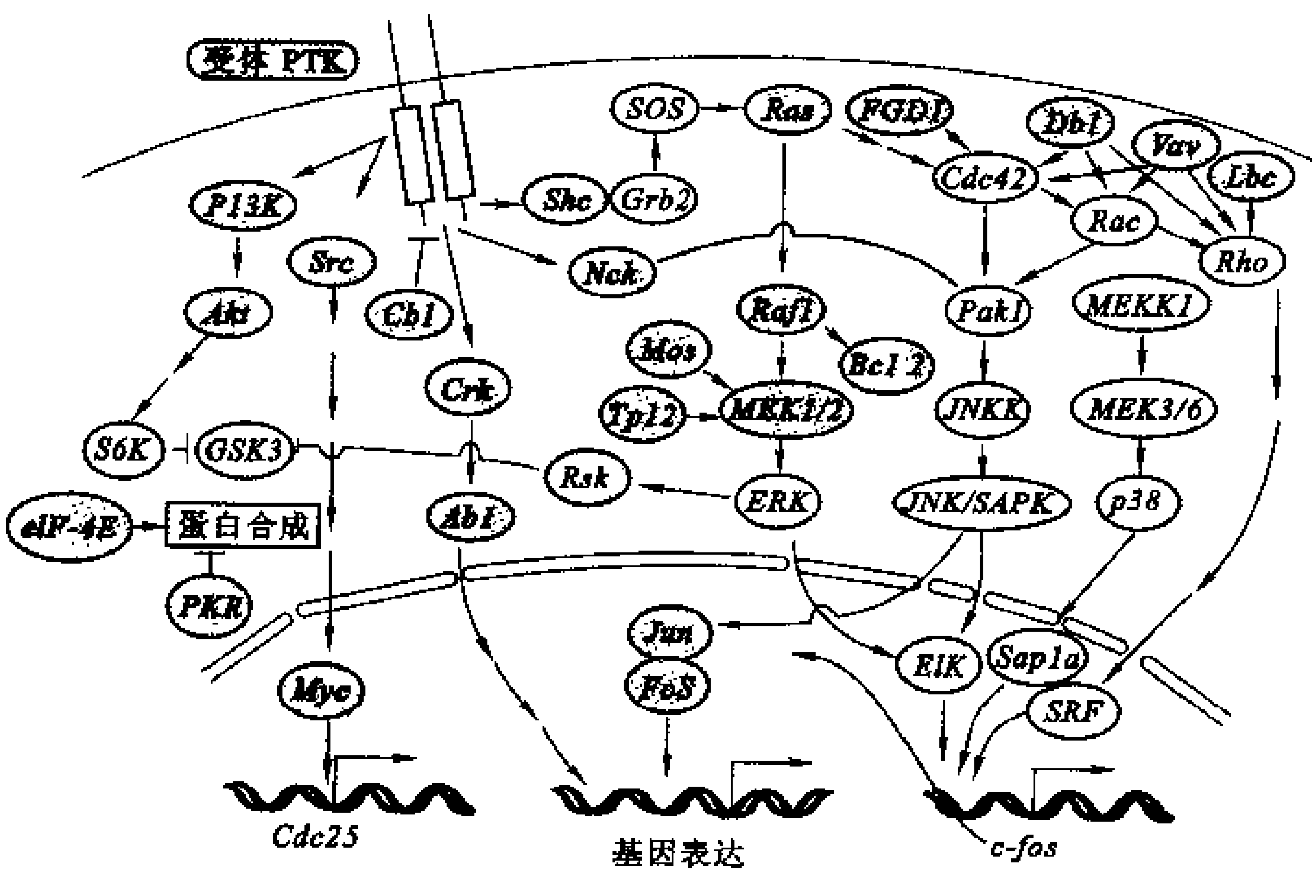


图 12－3　细胞增殖调控中的原癌基因(灰圈)与抑癌基因(白圈)示意图

三、肿瘤的发生是基因突变逐渐积累的结果

根据DNA复制过程中的基因突变率及人的一生中细胞分裂次数推测，在人的一生中，其基因组中每个基因都可能发生10^{-10}次的突变。如果再考虑生活环境中的致癌因素（如辐射等物理因素，化学诱变剂等化学因素和肿瘤病毒感染等生物因素），令人们感到惊奇的并不是细胞为什么会癌变，而是肿瘤的发生频率为什么如此之低。

根据大量的病例分析，癌症的发生一般并不是单一基因的突变，而至少在一个细胞中发生5～6个基因突变，才能赋予癌细胞所有的特征，即癌细胞不仅增殖速度快，而且其子代细胞能够逃脱细胞衰老的命运，取代相邻正常细胞的位置，不断从血液中获取营养，进而穿越基膜与血管壁在新的组织部位安置、存活与生长。

因此细胞基因组中产生与肿瘤发生相关的某一原癌基因的突变，并非马上形成癌，而是继续生长直至细胞群体中新的偶发突变的产生。某些在自然选择中具有竞争优势的细胞，再经过类似的过程，逐渐形成具有癌细胞一切特征的恶性肿瘤。如直肠癌发生的病程中开始的突变仅在肠壁形成多个良性的肿瘤（息肉），进一步突变才发展为恶性肿瘤（癌），全部过程至少需要10～20年或更长时间（图12-4）。因此从这一点上看，癌症是一种典型的老年性疾病，它涉及一系列的原癌基因与肿瘤抑制基因的致癌突变的积累。

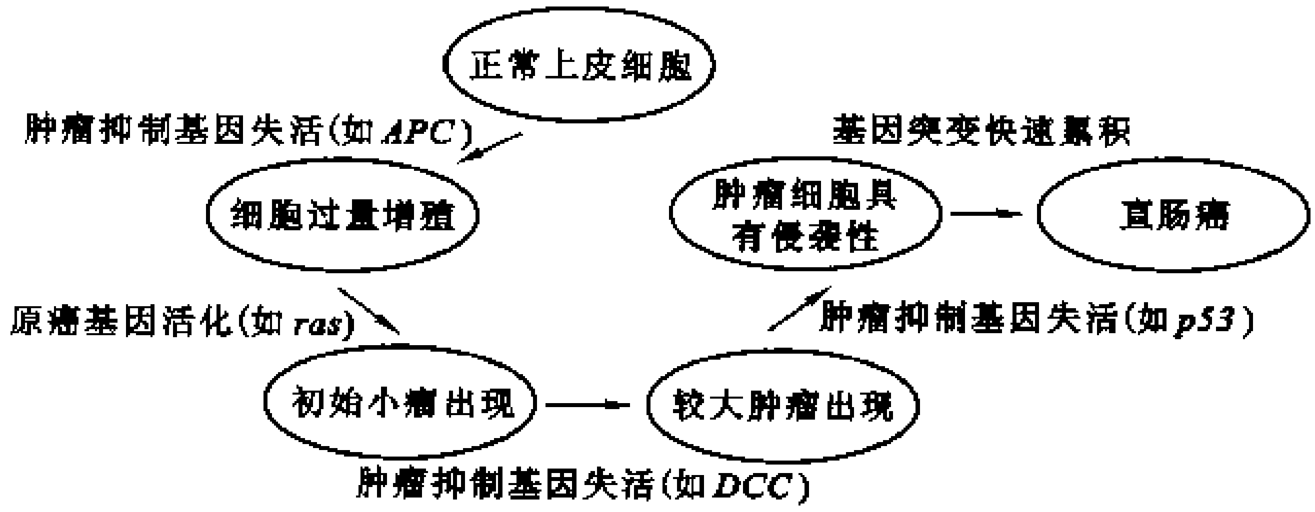


图12-4 直肠癌发生示意图

在人的二倍体细胞中肿瘤抑制基因有两个拷贝，只要其中一个基因拷贝正常，便可保证正常的调控作用。如两个基因都丢失或失活，才能引起细胞增殖的失控，而原癌基因的两个拷贝中只要有一个基因发生突变，便可能起到与癌基因类似的作用。

在某些癌症病例中，其生殖细胞中原癌基因或肿瘤抑制因子发生致癌突变，致使体内所有的体细胞的相应基因都已变异。在这种情况下，癌变发生所需要的基因突变数的积累时间就会减少，携带这种基因突变的家族成员更易患癌症。

第三节　真核细胞基因表达的调控

原核细胞基因表达与调控在很大程度上取决于环境的诱导和对环境的适应，而对于真核细胞，特别是由数百种不同类型的细胞构成的高等动植物，其基因表达与调控更多地表现在细胞分化和细胞"社会"的协同与稳定。

过去，生物学家曾认为："细胞分化伴随着某些遗传信息的丢失"。直到20世纪50～60年代，随着一系列关键性实验，这一想法终被屏弃。实验表明，已经分化了的细胞仍保留着细胞全能性(植物)和细胞核全能性(动物)。例如，康奈尔大学的F. Steward等证实了从成熟植物体上分离下来的单个细胞，在适当的条件下，经诱导能长成一株完全发育的植株，而且含有自然条件下正常植株所有类型的细胞。虽然来自成熟动物的单个细胞不能长成新个体，但实验表明这些细胞的核仍包含了发育成新个体的所有必要遗传信息。1997年，Ian Wilmut和他的同事们公布了第一个克隆哺乳动物(Dolly羊)。为了完成这一目前备受争议的成果，他们准备了两种细胞：一种是去核的未受精的绵羊卵细胞，另一种是取自一头成年雌绵羊的乳腺并经过培养的细胞。去核卵细胞与乳腺细胞经电脉冲技术使其融合，该程序实质上是细胞核移植。其后，依靠来自新核的遗传指令，这个卵细胞就发育成一只健康的小羊。上述实验说明，分化细胞的核，无论是来自植物的根还是动物的腺体，都含有分化成许多不同类型细胞所必需的遗传信息。通常一个细菌细胞拥有足以编码大约3 000种多肽的DNA，其中约有三分之一会在任何时间都会典型表达。与此对照，一个人的细胞拥有足以编码几百万种多肽的DNA(60亿 bp)，尽管这些DNA中的大多数实际上并不含有编码蛋白质的信息，但据估计，哺乳动物在其一生中还是能合成100 000种不同的多肽。由此估计，一个典型的哺乳类细胞任何时候都在制造大约5 000种不同的多肽。这些多肽的大部分，如糖酵解酶系和呼吸链中的电子传递体，实际上所有体细胞都能合成。与此同时，每种细胞又都在合成与分化状态相应的特有蛋白质。由于在真核细胞中，DNA信息量大，合成的蛋白质种类繁多，因此，真核细胞基因表达的调控是非常复杂的过程，而对它的深入认识可以说才刚刚开始。

想象一下，从一个骨髓的多能造血干细胞发育成一个红细胞的情形。在红细胞的蛋白质中，血红蛋白(hemoglobin)占了95%，但编码血红蛋白的基因在总DNA中还占不到百万分之一。这就意味着细胞不仅要像大海捞针般地在染色体中找到必需的基因，而且对基因表达的调节必须达到高度精密的程度，以使这寥寥几种多肽的合成在细胞中成为占支配地位的活动。由于导致特定蛋白质合成的系列事件是由若干步骤组成的，所以真核细胞基因表达的调控是多级调控系统(multistage regulation system)，主要发生在三个彼此相对独立的水平上(图12－5)：转录水平的调控(transcriptional-level control)，决定某个基因是否会被转录，并决定转录的频率；加工水平的调控(processing-level control)，决定初始mRNA转录物(hn RNA)被加工为能翻译成多肽的信使RNA(mRNA)的途径；

翻译水平的调控(translational-level control),决定某种 mRNA 是否会真正得到翻译,如果能得到翻译,还决定翻译的频率和时间长短。

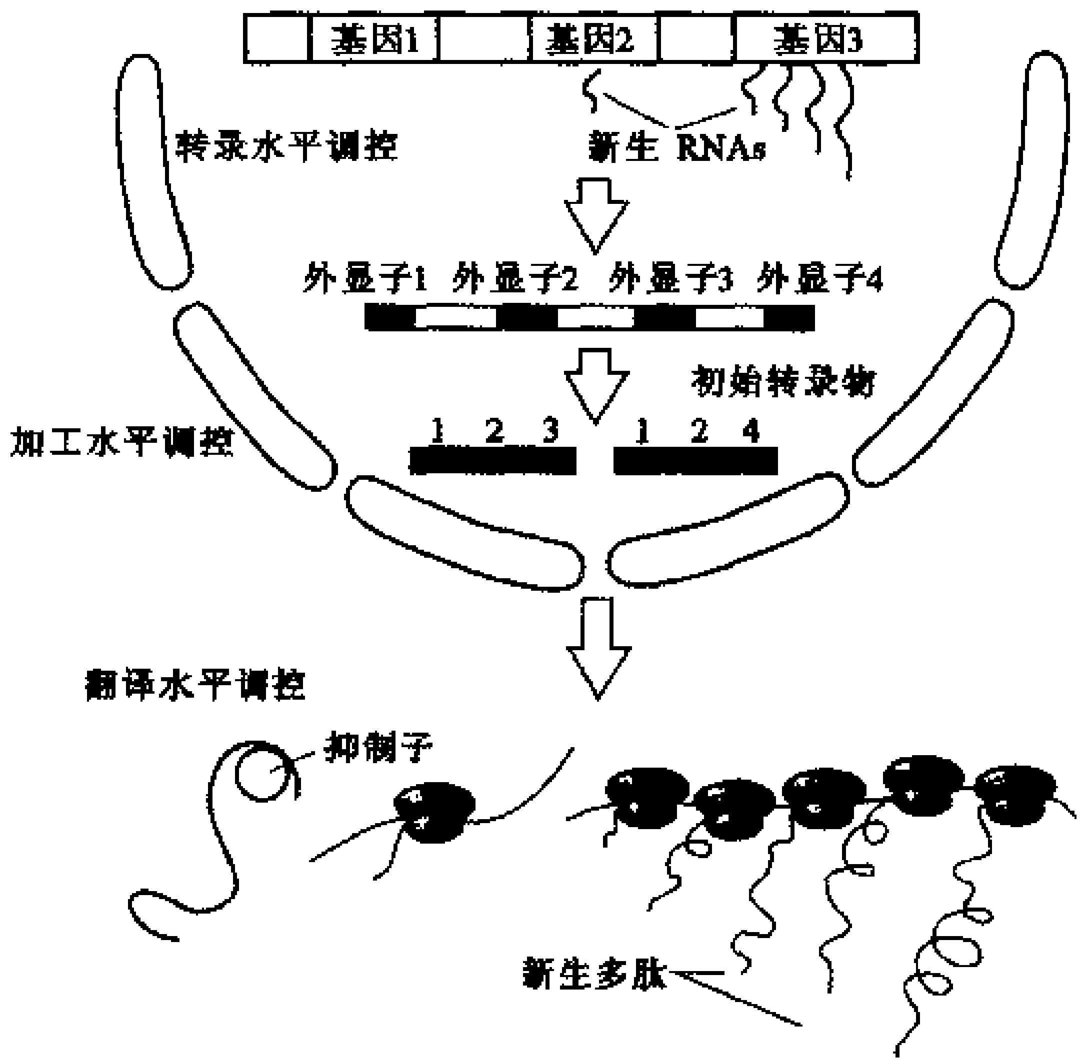


图 12-5 真核细胞基因表达的不同调控水平示意图

一、转录水平的调控

(一) 真核生物的转录激活

正如原核细胞一样,差别基因转录(differential gene transcription)是一种重要的调控机制,在特定时间真核细胞通过差别基因转录选择性地合成蛋白质。许多事实表明,在胚胎发育的不同阶段,不同的组织以及暴露在不同刺激下的细胞,其表达的基因均不相同。近十年来,关于在特定细胞内,某些基因在其他基因均无转录活性的情况下是如何转录的研究取得了很大进展。转录调控由为数众多的蛋白质即转录因子(transcription factors)的作用所主导。这类蛋白质从功能上可分为两类:通用转录因子(general transcription factors),与结合 RNA 聚合酶的核心启动子位点结合;特异转录因子(specific transcription factors),与特异基因的各种调控位点结合,促进或阻抑这些基因的转录。事实上,即使知道了一些转录因子的结构和它们与靶 DNA 序列之间的相互作用,有时仍不能勾画出它们调控机制的统一蓝图。有时单个基因可能被许多不同的 DNA 调控位点调节,而这些位点又与各种不同的调控蛋白结合。另外,一个 DNA 结合蛋白又可联系周围的许多位点,从而控制许多不同基因的表达。基因转录水平的调控

错综复杂，且受多种因素影响，包括转录因子与特异 DNA 序列的亲和力，及其与 DNA 邻近位点结合的转录因子之间彼此协同作用的能力。

基因转录调控固有的复杂性可以通过研究单基因（以 *PEPCK* 基因为例）内部及周围 DNA 来说明。磷酸烯醇丙酮酸羧激酶（phosphoenolpyruvate carboxykinase，PEPCK）是葡萄糖异生作用的关键酶之一，在代谢途径中，将丙酮酸转化为葡萄糖。当久未进食，体内葡萄糖水平降低时，就会在肝细胞中合成此酶；相反，如刚消化了一餐高糖食品之后，该酶的合成明显下降。PEPCK mRNA 的合成水平是由多种不同的转录因子共同调控的，包括多种参与调节糖代谢的激素受体。探明 PEPCK 基因表达调控的关键在于：① 阐明为数众多的位于启动子内部的 DNA 调控序列即顺式作用元件（cis-acting elements）的功能；② 确定与这些调控序列结合的转录因子即反式作用因子（trans-acting factors）；③ 解释信号通路即应答选择性基因表达的激活机制。

该基因最邻近的上游调控序列是 TATA 框，它是基因启动子（promoter）的一个主要元件，启动子位于基因上游的一个调节区，它与 RNA 聚合酶结合并调节转录的开始，TATA 框是许多通用转录因子的装配位点（assembly site），这是 RNA 聚合酶Ⅱ转录真核基因至关重要的前提。除 TATA 框序列之外，另外两种启动子序列称作 CAAT 框和 GC 框，它们对 RNA 聚合酶起始一个基因的基础水平的转录往往是必需的。CAAT 框、GC 框与转录因子结合（如 NF1 和 SP1），存在于许多组织中并广泛参与基因表达调控。一方面 TATA 框决定转录起始的位点，另一方面 CAAT 框和 GC 框决定 RNA 聚合酶转录基因的效率。这三种普遍的启动子元件的位置见图 12－6 第 1 行。



图 12－6　基础转录所必需的启动子序列的鉴定

第 1 行表示 *PEPCK* 基因启动子区一段单股核苷酸序列，标明了 TATA 框、CAAT 框和 GC 框；第 2～6 行表示启动子不同特定区域缺失的实验结果，各种情况下观察到的 *PEPCK* 基因基础转录水平如右列数据所示

现有两种被普遍采用的方法用于鉴定启动子区域上述特殊位点的功能，一是缺失作图法（deletion mapping），这种方法要求制备基因启动子区带有各种不

同缺失的 DNA 分子(图 12－6),然后用这些带有不同缺失的 DNA 分子转染细胞,最后确定细胞转录那些转染 DNA 的能力。在许多情况下,少数几个核苷酸的缺失并不影响它邻近基因的转录或者说影响很小。然而,如果这些缺失涉及上述几个顺式作用元件时,转录的水平将显著降低(图 12－6 第 2、4、5 行)。若启动子区其他部分缺失,则对基础转录的影响较小(图 12－6 第 3、6 行);另一种是 DNA 足迹法(DNA footprinting),当转录因子与 DNA 特异序列结合,可以防止该序列被核酸酶降解,根据这一特性,从细胞中分离染色质并用 DNA 消化酶(DNA－digesting enzymes)处理,则将降解未与转录因子结合而受到保护的 DNA 区域。一旦染色质被消化,结合蛋白被去除,即可通过凝胶电泳鉴定被转录因子保护的 DNA 序列,一旦这些序列被鉴定,便可用于进一步实验来分离识别各种特异序列的转录因子。

具有完整启动子的大部分 DNA 都能起始基础水平的转录,然后这种基础水平的转录由结合在 DNA 其他位点上的特异转录因子(活化剂和阻抑物)所调控(促进或阻抑)。

影响 *PEPCK* 基因表达的各种激素中有胰岛素、甲状腺激素、胰高血糖素、糖皮质激素等,它们都是作为与 DNA 结合的特异转录因子而起作用。现以糖皮质激素(glucocorticoids)为例,糖皮质激素是在应激反应中由肾上腺合成的一组甾类激素,它与特异 DNA 序列结合而促进 *PEPCK* 基因表达,该 DNA 序列称为糖皮质激素反应元件(glucocorticoid response element,GRE)。当甾类激素透过膜进入靶细胞,就与胞质中糖皮质激素受体蛋白结合,导致受体构象的改变,并促使它与另一受体分子相互作用形成二聚体。结合配体的二聚体转移进入细胞核并与 DNA 分子中 GRE 序列特异性结合。受体－激素复合物作为一种"活化的"转录因子与基因组中不同的 GREs 结合(包括位于 *PEPCK* 基因上游的 GRE),从而增加基因转录起始速率。相同的 GRE 序列位于不同染色体上不同基因的上游,这就使单个刺激(糖皮质激素浓度的升高)能同时激活综合性应激反应所必需的多个基因。

除上述启动子内部和周围的 DNA 序列外,大多数基因的表达还受到远处 DNA 元件即增强子(enhancer)的调控。增强子与其他 DNA 调控元件相比有其独特的性质:它们在一个 DNA 分子内可以试验性地迁移,从一个地方转移到另一个地方,甚至颠倒(旋转 180°),但不影响结合转录因子促进转录的能力。一个增强子的缺失可使转录水平降低 100 倍或更多。尽管增强子和启动子之间可被大量核苷酸所隔离,有的增强子位于离它们所作用的基因上游或下游成千上万对碱基,但增强子仍可能通过影响启动子而促进转录。因为增强子与启动子之间的间隔 DNA 能形成环,因此它们也能靠得很近,通过结合蛋白之间的相互作用帮助 DNA 形成环化结构已经得到证实。与增强子结合的转录因子能通过下列方式促进转录:① 诱导染色质变化,促进基础转录装置(如 TFⅡB,TFⅡD 和 RNA 聚合酶Ⅱ)在启动子处的装配;② 结合增强子的转录因子与结合在基因启动子上的基础转录装置的各种组分相互作用并激活基础转录装置的活性(图

12－7)。

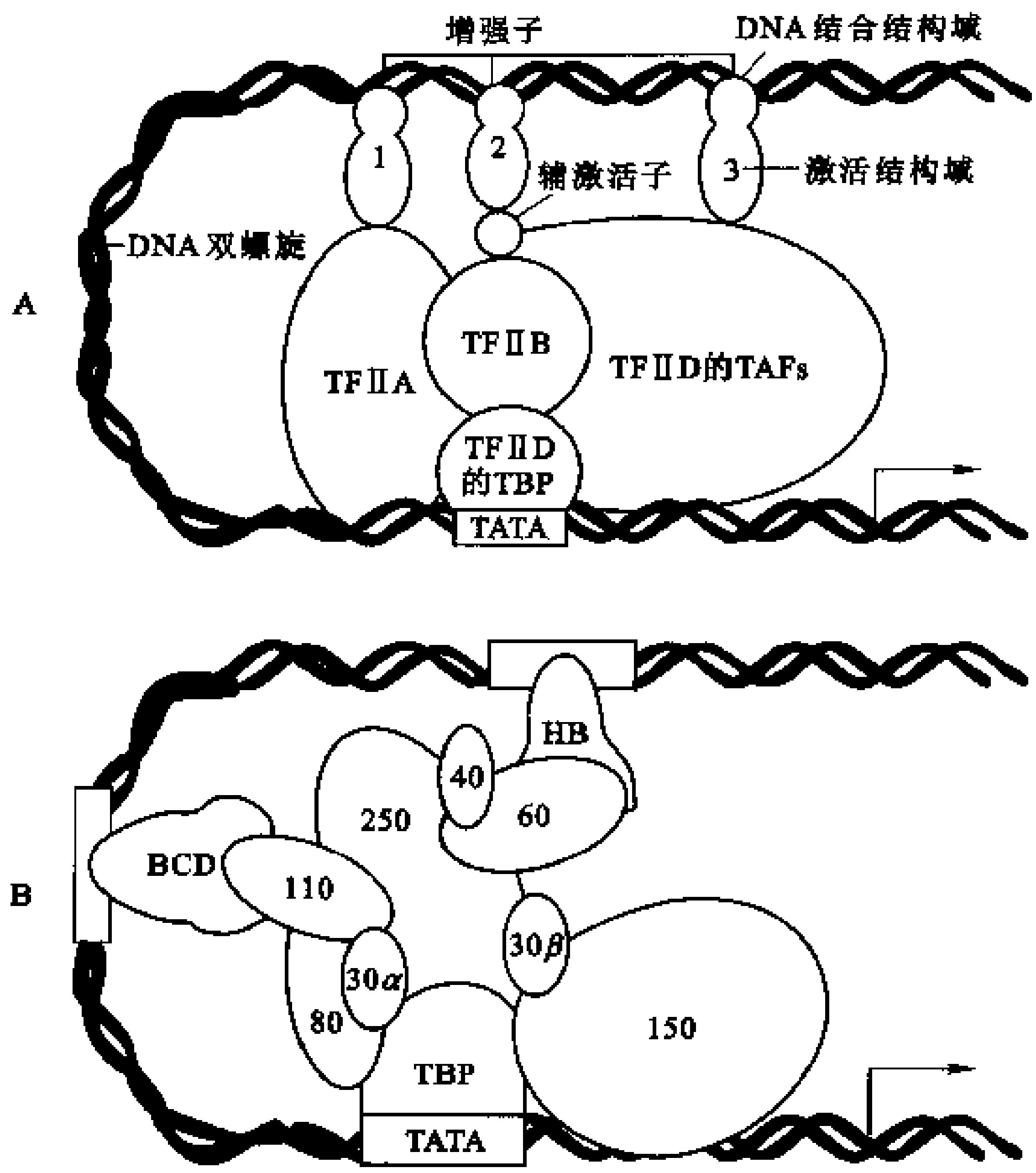


图 12－7　转录激活机制的模型

A：二种与 DNA 结合的转录因了(图中标明为 1、2、3)以三种不同的方式与基础转录装置的组分相互作用。第 1 个转录因子(激活子)与通用转录因子 TFⅡA 直接结合而相互作用；第 2 个转录因子(激活子)通过一中介的辅激活子(coactivator)间接与通用转录因子 TFⅡB 结合而相互作用，辅激活子作为接头蛋白(adaptor)而行使功能，将与 DNA 调控位点结合的特异转录因子和与启动子结合的通用转录因子联系起来；第 3 个转录因子(激活子)与 TFⅡD 的--个亚单位结合。通用转录因子 TFⅡD 包括 TATA 结合蛋白(TBP)和多种其他亚单位，这些亚单位统称为 TBP 结合因子(TBP－associated factor，TAFs)，TAFs 能同时传递几种不同活化剂信号

B：果蝇属(*Drosophila*)转录激活的特例，两种不同转录因子 bicoid(BCD)和 hunch-back(HB)，特异地与 TFⅡD 不同的亚单位相互作用(图中数字表示组成 TFⅡD 蛋白的每种 TAFs 的相对分子质量/10^3)，这些蛋白质之间的相互作用都由中间插入的 DNA 环所协助

像大多数蛋白质一样，在转录水平上参与基因表达调控的转录因子也含有不同的结构域，以介导蛋白质功能的不同方面，典型的转录因子至少包括两个结构域：一个 DNA 结合结构域(DNA－binding domain)，它结合 DNA 的特异碱基对序列；另一个是激活结构域(activation domain)，它通过与其他蛋白质相互作

用激活转录。此外，许多转录因子还含有一个促进该蛋白与其他蛋白形成二聚体的表面，二聚体的形成被证明是许多不同类型转录因子的共同特征，在基因表达调控中起重要作用。通过比较大量的转录因子的DNA结合结构域发现，大多数转录因子都具有与DNA序列相互作用的几种相关结构模式，在DNA结合蛋白中最常见的结构模式是“锌指”、“螺旋－转角－螺旋”、“螺旋－环－螺旋”、“亮氨酸拉链”结构和HMG框。DNA结合蛋白几大家族的存在事实提示，在进化中已出现了构建可结合DNA双螺旋的多肽的多种不同机制。绝大多数这种结构模式都含有一段插入DNA双螺旋大沟的结构（通常是一个α螺旋），并识别其碱基序列。这些基因表达调控蛋白与DNA的结合是靠氨基酸残基和DNA各部分（包括骨架链）之间形成范德华力、离子键和氢键来完成的。DNA结合蛋白不同的结构模式分别提供了一个结构上稳定的框架，蛋白质的特异DNA序列识别表面被正确定位在此框架上并和DNA双螺旋相互作用。从真菌到各种动、植物，在调节不同类型细胞活动的大量蛋白质中都发现了这些结构模式。不过应当注意的是尽管转录因子是调节基因表达的主要因素，但它并不是唯一的调控机制。

（二）真核生物的转录阻抑

原核细胞的转录阻抑（transcriptional repression）主要依赖子阻抑物（repressor），即一种能与DNA结合并阻断附近基因转录的蛋白质。尽管对真核生物基因表达的研究主要集中在转录激活及其调控元件和调控蛋白方面，但很明显真核细胞也同样具有负调控机制。许多与特异启动子元件结合的负调控蛋白已被鉴定，这些负调控蛋白能阻断启动转录所必需的前起始复合体（preinitiation complex）的装配。还有一些阻抑物能与上游DNA序列结合，并抑制转录激活子（transcriptional activator）的结合或其功能。因此，像原核细胞一样，一个真核细胞在特定的生命时期某特定基因的转录方式主要依赖于正调控与负调控因子的平衡。

现有研究发现，DNA甲基化（DNA methylation）与基因表达阻抑有关。对哺乳动物及其他脊椎动物的DNA研究表明，每100个核苷酸就有一个含有甲基基团，并通常是结合在胞嘧啶的5′－C位上。这种简单的化学修饰被认为是一种“标记”，使特定的DNA区域与其他区域区别开来。几乎所有的甲基化胞嘧啶残基都出现在对称序列（symmetrical sequence）的5′－GC－3′二核苷酸上。这种序列在DNA上并不是随机分布，而是趋向于集中在GC富含“岛”（GC－rich island）上，GC“岛”常位于转录调控区或其附近。

脊椎动物的DNA甲基化是一个动态修饰过程，酶既能将甲基加上，也能将甲基除去。细胞内负责甲基化修饰作用的有两类酶：一是维持性甲基化酶（maintenance methylase），可在甲基化的DNA模板链指导下使其对应部位发生甲基化；二是构建性甲基化酶（establishment methylase），它不需要甲基化的DNA模板作指导，可以使完全非甲基化的DNA完成甲基化修饰。实验表明，一个完全非甲基化的DNA分子注射到小鼠受精卵中，它们几乎每个CG位点都会

被加上甲基基团。由于维持性甲基化酶不能使完全非甲基化的 DNA 甲基化，因此在卵中必然存在一种构建性甲基化酶，但这种酶很快消失，于是发育中的组织细胞的 DNA 依靠维持性甲基化酶维持其甲基化的核苷酸。在哺乳动物一生中 DNA 甲基化水平存在显著地变化(图 12-8)。第一个主要变化发生在受精卵最初几次分裂时期，去甲基化酶清除 DNA 上几乎所有从亲代遗传下来的甲基化标记。其后，大约在胚胎植入子宫的时候，一种新的甲基化波遍布细胞，构建性甲基化酶使 DNA 重新建立一个新的甲基化模式。一旦细胞内新的甲基化模式建成，将通过维持性甲基化酶以"甲基化维持"的方式将新的甲基化模式传递到每个子细胞的 DNA 上。DNA 甲基化对哺乳动物的发育很重要，通过基因工程技术，剔除使老鼠产生新甲基化的酶，则幼鼠会在怀孕的中途死亡。

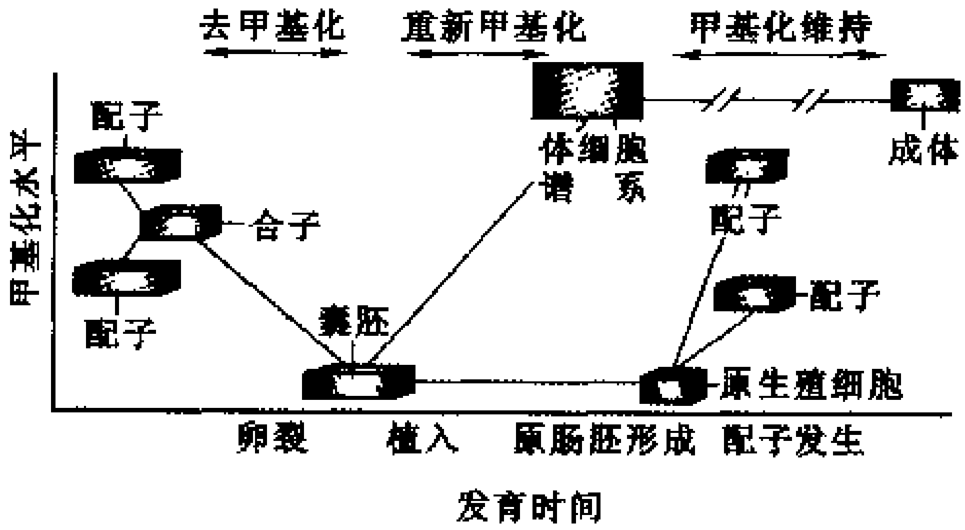


图 12-8　在哺乳动物发育过程中，DNA 甲基化水平的变化
(引自 R. Jaenisch, 1997)

受精卵的 DNA 大量被甲基化，卵裂期基因组全面去甲基化；植入后，细胞内 DNA 重新甲基化，到胚胎时甲基化水平增高，而原生殖细胞 DNA 保持非甲基化状态，到配子形成晚期生殖细胞被甲基化，成体的生殖细胞甲基化水平增高，在发育晚期和成年期体细胞保持甲基化较高的水平

利用特异性切割 CG 二核苷酸对的限制性内切酶可以检测 DNA 甲基化与否。HpaII识别并切割未甲基化的 CCGG 序列，但对甲基化的 CG 二核苷酸对则不起作用；而 MspI则可以识别并切割所有 CCGG 序列，不管是否甲基化。因此，可用MspI来鉴别 CCGG 的存在，用 HpaII来鉴别这些 CCGG 序列是否甲基化。

应用上述限制性内切酶对许多生物的不同 DNA 序列进行检测，发现非活跃转录基因的 DNA 甲基化程度普遍高于活跃转录的基因；而且，含有甲基化 DNA 的非活性基因在基因活化后通常伴随失去许多甲基基团。因此有人把活性基因的状态称为甲基化不足(under methylation)。在发育过程中，正处于活化状态的基因的调节区的甲基化水平会显著下降。例如，与其他组织相比，在婴儿肝细胞 DNA 中，位于 γ 球蛋白基因上游区域的甲基化水平显著降低。造成这种差异的原因是在婴儿发育期，这个基因处于高水平转录状态。特别是许多活跃表达的基因，虽然 3′端保持甲基化，但其 5′端是非甲基化的，这被认为与基因

被转录的能力有关。许多研究证据表明,DNA 甲基化对维持基因处于非活化状态比其作为起始失活机制起的作用更大。比如,雌性哺乳动物一条 X 染色体上基因的失活发生在细胞甲基化波出现之前,这被认为是使 DNA 转入一个更持久地被阻抑的条件。

甲基化作用通过两种方式抑制转录:一是通过干扰转录因子对 DNA 结合位点的识别;二是将转录因子识别的 DNA 序列转换为转录阻抑物的结合位点。

不过需要指出,DNA 甲基化和去甲基化与基因活性的关系并不是绝对的,DNA 甲基化也不是使基因表达失活的一种普遍机制。脊椎动物尤其是哺乳动物比无脊椎动物甲基化程度高得多。有些无脊椎动物如果蝇和其他双翅目昆虫至今未发现 DNA 甲基化,这说明 DNA 甲基化是一种进化事件,并随进化程度的提高而逐步增强,因此甲基化和去甲基化在基因表达活性调控中的意义依生物不同而有差异。比较而言,植物的 DNA 常表现高度甲基化。正如动物的情况一样,研究人工培养的植物细胞表明,植物细胞 DNA 的甲基化与基因的失活相关。最新研究发现,应用反义寡聚核酸(antisense oligonucleotide)技术可以干扰与 DNA 甲基化相关的甲基转移酶(methyl transferase)的合成,经过该技术处理的植物,DNA 甲基化水平显著降低,结果植物花柄的数目大大增加,这些花柄上着生的花在形态上也有显著变化。

基因组印记(genomic imprinting)是说明甲基化作用在基因表达中具有重要意义的最好例证,也是哺乳动物所特有的现象。直到 20 世纪 80 年代中期人们还认为,自父亲遗传来的一套染色体与相应自母亲遗传来的一套染色体在功能上是等价的。但根据许多更深人的研究结果表明,这并不是实际情况。事实上,在哺乳动物发育早期,某些特定基因是活化还是失活仅仅依赖于它们是否被精子或卵子带入受精卵。例如,在小鼠的早期发育中,编码类胰岛素生长因子 2(insulinlike growth factor 2, IGF2)的基因只在由父亲传递下来的染色体上有活性,而编码这种蛋白的受体(IGF2R)的基因,只在由母亲传递下来的染色体上有活性。这些类型的基因被认为是按照其亲本的来源带上印记。据估计,哺乳动物的基因组含有超过 100 个这类基因,定位在几个不同的差异表达类型的染色体群(chromosomal cluster)。

印记模式的失真,特别是那些定位在 15 号染色体上一簇带有印记的基因的失真与很多罕见的人类遗传失调(genetic disorder)有关。Prader-Willi 综合症(PWS)是一种可遗传的神经紊乱,表现为智力迟钝、肥胖和性腺发育不全。当从父亲遗传来的 15 号染色体携带有包含印记基因的一段很小的缺失时,这种神经紊乱就显现出来。因为父亲染色体带有一个基因的缺失,而母亲染色体带有一个无活性的印记基因,所以个体缺乏有功能的基因拷贝。

由于双亲印记基因的模板在甲基化模式上保持不同,所以 DNA 甲基化在基因组印记中具有重要作用。在某些情况下,甲基化不足的基因模板是有活性的,反之,在另一些情况下,含有额外甲基的基因是有活性的,而甲基化不足的模板是无转录活性的。印记基因的这些差异,不受在早期胚胎中出现的去甲基化

和复甲基化波以及改变非印记基因甲基化状态的影响。生殖细胞有例外，当个体产生配子(精子或卵)的时候，从亲本遗传来的印记必须消除以便重排。必定存在某种机制，在精子形成时某些特殊的基因(如 *IGF2γ*)带上失活的标记，而另一些基因(如 *IGF2*)在卵子形成时带上失活的标记。无论通过哪种机制，DNA 的甲基化在构建和维持印记状态方面都起着关键作用。

二、加工水平的调控

细胞的蛋白质通常是由多基因家族的成员编码的。构成多基因家族的各种基因是在进化过程中，从一个简单原始基因经过重复复制并产生序列分歧演化而来的。一个基因家族编码一组具有功能联系的同源蛋白质，因此多基因家族的形成是产生蛋白质多样性的一种进化机制。此外，蛋白质多样性也能在个体内，通过选择性剪接(alternate splicing)而产生，这是在 RNA 加工水平上调节基因表达的重要机制。

选择性剪接是一种广泛存在的 RNA 加工机制，通过这种方式，一个基因能编码两个或多个相关的蛋白质。我们知道，大多数真核细胞的基因为不连续基因，除编码的外显子(exon)之外，还有较长的不编码的内含子；而且在转录时整个基因(包括外显子和内含子)都被忠实地转录，形成细胞内 mRNA 的前体。在细胞内 mRNA 的前体有两种基本剪接方式：一是编码蛋白质的不连续基因通过 RNA 剪接将内含子从 mRNA 前体中去除，然后规范地将外显子剪接成成熟的 mRNA，这种剪接方式称为组成型剪接(constitutive splicing)。通过组成型剪接，一个基因只产生一种成熟的 mRNA，一般也只产生一种蛋白质产物；另一种剪接方式是可调控的选择性剪接。真核生物中有些基因的 mRNA 前体有几种不同的剪接方式，因而产生不同的成熟 mRNA，翻译产生不同的蛋白质。不过，一般情况下通过选择性剪接所导致的外显子改变并不产生根本不同的蛋白质，而是产生一套结构相关、功能相似的蛋白质异形体(protein isoforms)。

在许多情况下，一个特定的 mRNA 前体被加工的途径不只一条。一种最简单的情况是，一个特殊的内含子可以从转录物上剪切掉，也可以作为最后mRNA 的一部分保留下来。这种类型的选择性剪接的一个典型例子是纤连蛋白的合成，这种蛋白在血浆和胞外基质中均存在，但由成纤维细胞产生并滞留在基质中的纤连蛋白与由肝细胞产生并分泌到血浆中的这种蛋白相比，多了两条肽段。这两条肽段是由 mRNA 前体的一部分编码的，这部分 mRNA 前体序列在成纤维细胞中加工时被保留下来，而在肝细胞中加工时被切除。

在大多数情况下，某一特定基因经过选择性剪接产生的蛋白质在长度上是相等的，但在关键区域却有所不同，这些区域会影响一些重要性质，如蛋白质的胞内定位，它们所结合的配体类型或者其催化活性动力学性质。例如，抗体分子既可以是膜结合型蛋白，也可以是分泌型可溶性蛋白，这取决于两个可变外显子中哪一个定位在 mRNA 的 3′端。许多转录因子也是由能进行选择性剪接的基

因产生的，所以这些转录因子产生许多变异体，决定细胞不同的分化途径。例如果蝇在胚胎发育过程中，导致胚胎性别决定的发育途径就是通过某些基因的转录产物经过选择性剪接决定的。

由于在成熟 mRNA 产物中，可能存在的外显子的不同组合，使可选择性剪接变得十分复杂。根据这种机制，某一特定的外显子是否被包括在成熟 mRNA 内，主要取决于它的 3′和 5′端剪接位点是否被剪接机器选择为切割位点。有些剪接位点可用“弱”来形容，表示在一定条件下，它们可以不被剪接机器剪切。这种弱剪接位点的识别和使用被一段 RNA 序列所主宰，这段 RNA 序列称为剪接增强子(splicing enhancer)。剪接增强子位于那些保留与否受到调节的外显子内，其功能是作为特殊的调节蛋白的结合位点。如果某种特殊的调节蛋白在细胞内产生，这种蛋白很容易与剪接增强子结合，并进一步募集某些必要的剪接因子到 3′或 5′端弱剪接位点附近。这类剪接位点的使用导致外显子被包括在 mRNA 中(图 12-9)。如果细胞内不产生某种特殊的调节蛋白，则外显子附近的剪接位点就不会被识别，这个外显子就会随同侧翼的内含子一起被切除。

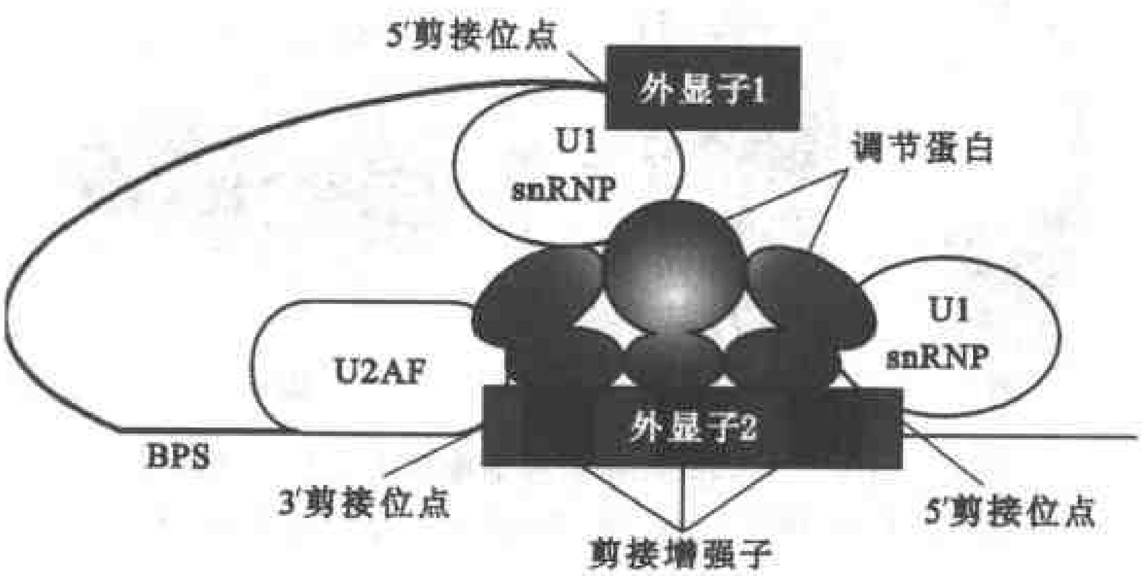


图 12-9 在选择性剪接的调节中，表示剪接增强子作用的模型

(引自 K.J. Hertel 等，1997)

在图中，外显子 2 含有 3 个结合特异调节蛋白的剪接增强子，这些被结合的调节蛋白分别募集关键剪接因子(U2AF)和 U1snRNP 到 3′和 5′端剪接位点附近；如果 U2AF 和 U1snRNP 没有被募集到外显子 2 两边的剪接位点上，则这个外显子就不会被识别；相反，它将会作为内含子的一部分而被切除

三、翻译水平的调控

真核细胞翻译水平调控包括多种不同的影响 mRNA 翻译的调控机制，这些成熟的 mRNA 是事先从细胞核转运到细胞质中的。在多种不同的调控机制中，我们侧重讨论三个方面：① 细胞内特定部位的 mRNA 的定位；② mRNA 是否被翻译及其翻译的频率；③ mRNA 的半寿期或 mRNA 稳定性的问题。

翻译水平的调控机制，一般都是通过细胞质中特异的 mRNA 和多种蛋白质

之间的相互作用来实现的。细胞质中成熟 mRNA 在 5′和 3′端都含有非编码片段，称作非翻译区（untranslated regions，UTRs）。5′UTR 从 mRNA 起点的甲基鸟嘌呤核苷帽延伸到 AUG 起始密码子，而 3′UTR 从编码区末端的终止密码子延伸至多聚(A)尾巴的末端。多年来，mRNA 非翻译区部分大都被忽视了，但近年来人们明显注意到，UTR 是大多数翻译调控的影响位点。

（一）mRNA 的细胞质定位

启动一个动物受精卵形成胚胎所需要的信息预存在卵子发生期的卵母细胞里。我们将简要地讨论一下果蝇，它的卵、幼虫和成虫期见图 12－10。果蝇幼虫和成虫的前后（头－腹）轴的发育由特定 mRNA 在卵母细胞中沿相同的前后轴向的定位所决定。例如，通过果蝇卵母细胞原位杂交显示，由 *Biocoid* 基因转录的 mRNA 优先定位在卵母细胞的前端，而由 *Oskar* 基因转录的 mRNA 定位在后端。由 *Biocoid* mRNA 编码的蛋白质在头部和胸部的发育中起重要作用，而 *Oskar* mRNA 编码的蛋白质对在幼虫后端发育的生殖细胞的形成是必需的。

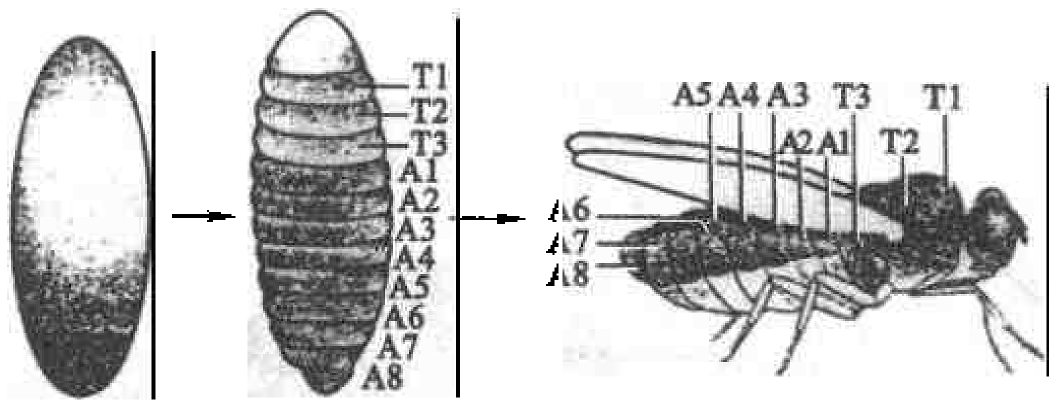


图 12－10　Drosophila 卵细胞细胞质中 mRNA 的定位
显示了果蝇生活周期的三个阶段：卵、幼虫和成虫，并标出了胸部和腹部体节

控制 mRNA 在细胞质中定位的信息位于 3′UTR，这可以用携带一个外源基因的果蝇来证明。这个外源基因的编码区和一段编码 *Biocoid* 或者 *Oskar* mRNA的 3′UTR 的 DNA 序列相连接，当该外源基因在卵子发生期被转录时，则转录的 mRNA 被定位在由 3′UTR 决定的位点上。虽然 mRNA 定位的机制还不很清楚，但可以认为是通过能识别 mRNA 中定位序列的蛋白质所介导的。

微管和微丝与细胞中特定部位的 mRNA 的聚集有一定关系。微管主要涉及转运 mRNA 到细胞质特定部位，实验表明，应用导致微管解聚的药物可以破坏 *Biocoid* mRNA 在果蝇卵母细胞中的正常定位；而微丝的作用被认为是用来锚定已到达目的地的 mRNA。为了证实这种结论，用非离子去垢剂 Triton X－100 抽提人的成纤维细胞，然后与特异性结合 mRNA 多聚(A)尾巴的胶体金标记的探针进行孵育，电镜观察发现，单个的 mRNA 分子经常地结合在细胞骨架网络的微丝交叉处。这些微丝可以提供一个固相表面，在这个表面上细胞质的遗传信息被组织起来。细胞质 mRNA 的定位不只限于卵细胞和卵母细胞中，在所有具有极性的细胞中也普遍存在。例如，在可迁移的成纤维细胞里，肌动蛋白

mRNA 主要定位在细胞边缘，因为那里恰好是细胞运动最需要肌动蛋白分子的地方。

（二）mRNA 翻译的调控

在许多脊椎动物和无脊椎动物的未受精卵细胞质中贮存许多 mRNA，它们是发育早期蛋白质合成的模板，但它们大部分在卵细胞质中本身并不用来翻译合成蛋白质，因为它们在卵细胞质中与抑制蛋白结合而失去活性，这些贮存在卵细胞中没有翻译活性的 mRNA 常被称作“隐蔽”mRNA（masked mRNA）。以未受精的海胆卵为例，如果将这种卵细胞悬浮在含有放射性标记的氨基酸的条件下进行培养，那么只有很少的放射性活性掺入到蛋白质中（图 12－11A）。然而，如果相同的卵细胞制备物加入精子受精后，则标记的氨基酸的掺入量即可测定，并且掺入率在以后的几小时里慢慢地增加。当胚胎发育到囊胚阶段（大约 1 000 个细胞），掺入率趋于稳定。“隐蔽”mRNA 从无活性到有活性状态的转变发生得相当快，以至于受精后蛋白质的合成都不能依靠新 mRNA 的合成。在受精之后，马上就被翻译的 mRNA 在和精子接触之前就已经存在于卵细胞中，如果海胆卵在有 RNA 合成抑制剂放线菌素 D（actinomycin D）存在的情况下受精并培养，则受精后的蛋白质合成的活性与对照培养的活性相同（图 12－11B）。因为在有放线菌素 D 存在的情况下不能产生新的 RNAs，所以蛋白质必然是依赖预存的 mRNA 模板合成的，这些 mRNA 是在受精后被激活的。这些预存 mRNA 的激活与两个不同的事件有关：一是结合的抑制蛋白被释放，二是通过卵细胞质中一种酶的作用使 mRNA 多聚（A）尾巴长度增加。

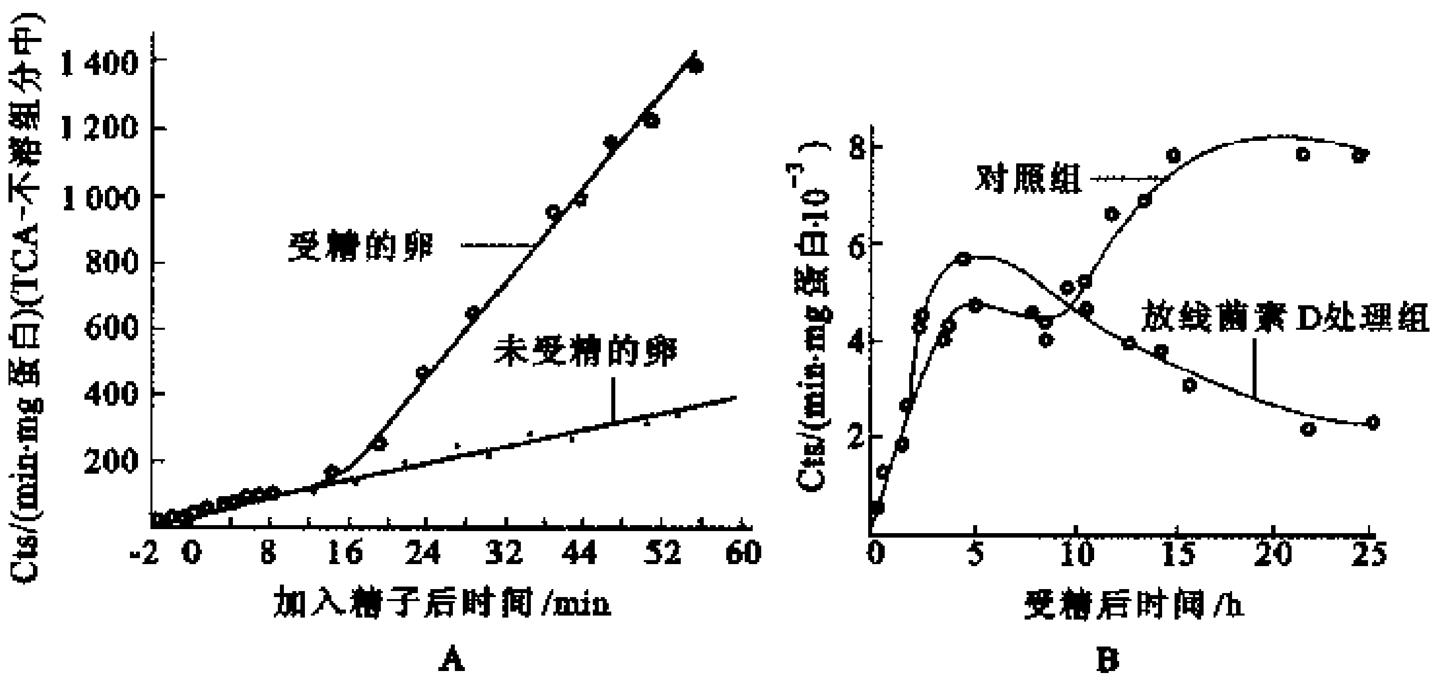


图 12－11 海胆卵受精后“隐蔽”mRNA 激活的实验证明

A：海胆未受精卵和受精卵对 ^{14}C－亮氨酸的累积掺入实验：0 时间表示受精的时刻；经短暂拖延之后，很快蛋白质合成速率呈现显著提高

B：在有和没有放线菌素 D 存在的情况下，海胆受精卵对 ^{14}C－缬氨酸的掺入率比较实验：在受精之后，蛋白质合成的起始增加不被放线菌素 D 所抑制，结果表明，受精后一段时间蛋白质合成并不依赖新合成的 mRNA 模板；相反，在受精之后 10 h，蛋白质合成的第二次增加却需要新的 mRNA 模板，因为它已被放线菌素 D 所抑制

现已发现几种调节 mRNA 翻译速率的机制，以响应细胞需求的变化。其中有些机制可被认为起全面性的作用，因为它们影响所有 mRNA 的翻译。当一个细胞遭遇某种重大刺激时，比如病毒感染、营养缺乏或热休克，那么一种激酶将被激活并使翻译起始因子 eIF2 磷酸化。磷酸化的 eIF2 将起始子 tRNA 引渡到"mRNA－核糖体"复合物上的活性将显著降低，从而减慢蛋白质合成的速率。其他机制的作用在于改变特定 mRNA 的翻译速率，其中研究最好的一个例子是编码铁蛋白(ferritin)的 mRNA。

铁蛋白是一种在细胞质内查封铁原子的蛋白，从而保护细胞免受游离金属原子的毒性影响。铁蛋白 mRNA 的翻译受一种特异性阻抑物的调节，这种阻抑物称之为铁调蛋白(iron regulatory protein, IRP)，它的活性依赖于细胞内非结合铁的浓度。在铁浓度低时，IRP 与铁蛋白 mRNA 的 5′UTR 特异序列结合(图 12－12)，这段特异序列称之为铁应答元件(iron-response element, IRE)。结合的 IRP 显然干扰了核糖体与 mRNA5′端的结合，从而抑制了翻译的起始；在铁浓度高时，IRP 被修饰，因而丧失对 IRE 的亲和性，使 IRP 从铁蛋白 mRNA 上解离下来，促使翻译装置与 mRNA 接近并使编码的蛋白合成。

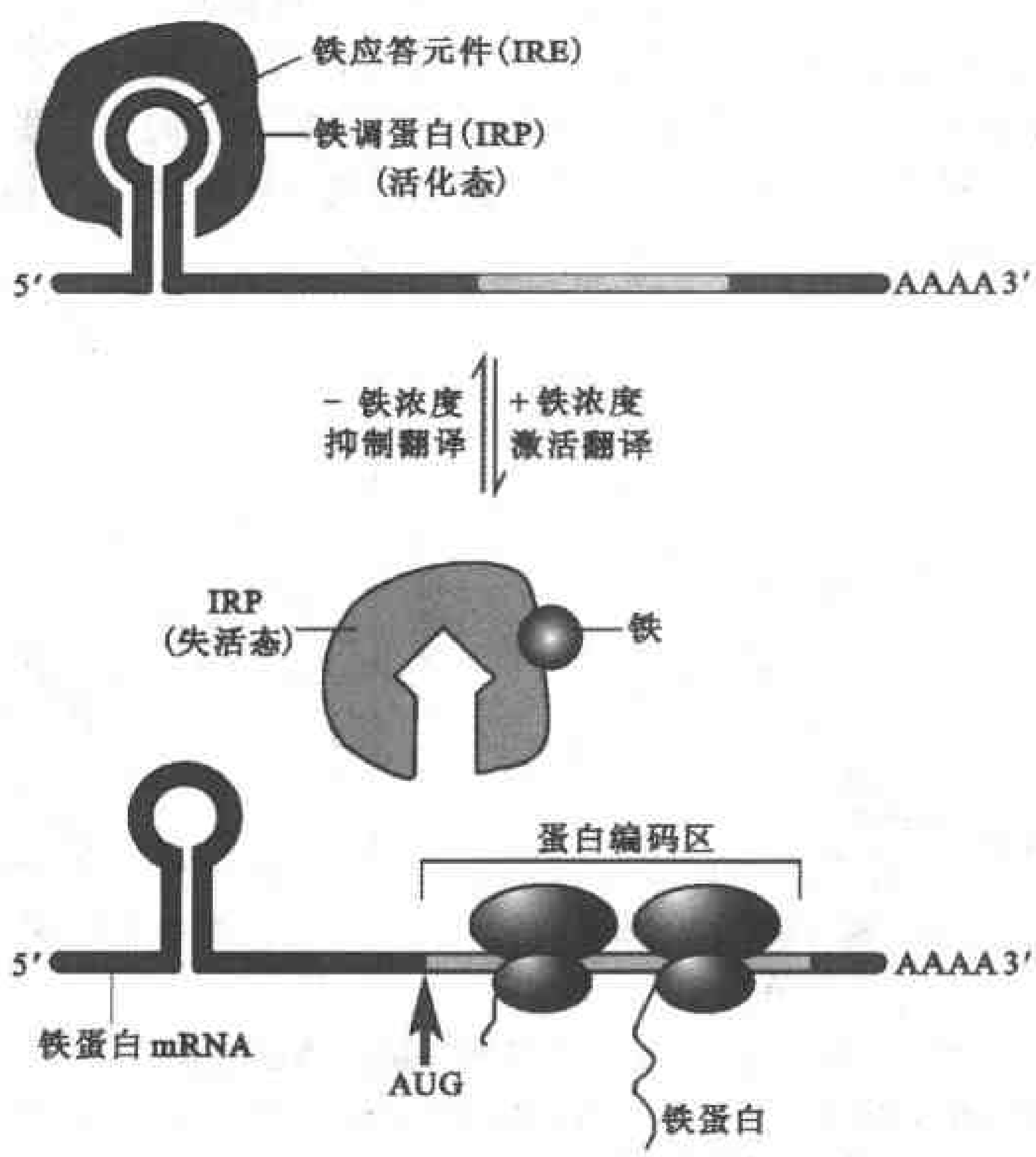


图 12－12　铁蛋白 mRNA 翻译的调控示意图

在铁浓度低时，铁调蛋白(IRP)与铁蛋白 mRNA 5′UTR 端的铁应答元件(IRE)结合；当铁浓度升高时，铁和 IRP 结合，改变其构象使其与 IRE 解离，并允许mRNA翻译形成铁蛋白

（三）mRNA 稳定性的调控

一种 mRNA 在细胞内存在得越久，它用来作为多肽合成模板的时间就越长。如果一个细胞要控制基因表达，则调节这种 mRNA 的生存和调节它的合成同等重要。不像原核细胞的 mRNA，边转录边翻译，甚至在它们的 3′端还未完全合成之前而 5′端就开始降解，大部分真核细胞的 mRNA 有相对较长的寿命，即便如此，真核细胞 mRNA 的半寿期仍有相当的差别。比如，涉及控制细胞分裂的 *fos* mRNA，在细胞内降解得很快（半寿期为 10～30 min），结果只有很短一段时间用来生产 Fos 蛋白。相反，编码特定细胞优势蛋白产物的 mRNA，像红细胞前身中的血红蛋白或母鸡输卵管细胞中的卵清蛋白，一般有超过 24 h 的半寿期。这样，随着 mRNA 的细胞质定位或 mRNA 翻译的起始速率不同，特定的 mRNA 可被细胞的调控装置所识别，然后予以不同的处理。

早期实验显示，缺乏多聚(A)尾巴的 mRNA 在被注射到细胞内后迅速降解，然而，同样的 mRNA 因拥有多聚(A)尾巴而相对的稳定，这是提示一种 mRNA的寿命与它的多聚(A)尾巴长度有关的第一个证据。当一种典型的 mRNA离开细胞核时，它含有一个大约 200 个腺苷酸残基构成的多聚(A)尾巴，这种多聚(A)尾巴并非裸露的核苷酸，而是与多聚(A)结合蛋白(poly(A) - binding protein，PABP)结合。每个 PABP 分子与大约 30 个腺苷酸残基结合，PABP 被认为具有双重作用：一方面蛋白质保护多聚(A)尾巴不受普通核酸酶降解；另一方面 PABP 似乎增加多聚(A)尾巴对特异的多聚(A)核糖核酸酶的敏感性。

哺乳动物细胞内 mRNA 的降解经途已经获得一些知识。在细胞质中的 mRNA，它的多聚(A)尾巴长度倾向于被多聚(A)核糖核酸酶一点一点地消化掉而逐渐减少，直至减少到大约只剩 30 个腺苷酸残基，而不足以保留一个结合的 PABP 分子时，才会观察到对 mRNA 稳定性的影响，即一旦多聚(A)尾巴减少到这个长度，通常 mRNA 会迅速降解。有趣的是，随着 mRNA3′端多聚(A)的逐渐清除，mRNA 也在 5′端帽子处开始降解，似乎在 mRNA3′端多聚(A)尾巴具有保护信使分子 5′端帽子结构的作用，该事实提示，有可能这两个末端的位置非常靠近。电镜观察到的多聚核糖体的环状结构进一步证实了这种在 mRNA3′和 5′端之间的 RNA 环化现象。一旦 3′端尾巴被消除，信使分子就摘去了帽子并开始从 5′端向 3′端降解。

鉴于不同的 mRNA 即使有相同长度的多聚(A)尾巴，半寿期也不尽相同，因此除了简单的多聚(A)尾巴长度的原因之外，必定还有更多的因素关系到 mRNA 的寿命。发现在 3′UTR 的核苷酸顺序的不同似乎在多聚(A)尾巴变短时扮演一个与降解速率有关的角色。在 α 珠蛋白 mRNA 的 3′UTR，包含许多 CCUCC 重复序列，这种序列被认为是稳定信使分子的特异性蛋白质的结合位点。如果这些序列产生突变，mRNA 就不稳定。相反，在短命的 mRNA 的 3′UTR经有富含 AU 的序列(如 AUUUA)，这种序列被认为是使信使分子不稳定的蛋白结合的位点。如果将这种使信使分子不稳定的序列导入珠蛋白基因的 3′UTR，则本来稳定的珠蛋白 mRNA 将变得不稳定。

提　要

在个体发育中，由一种相同的细胞类型经细胞分裂后逐渐在形态、结构和功能上形成稳定性差异，产生不同的细胞类型过程称之为细胞分化。细胞分化是基因选择性表达的结果。不同类型的细胞在分化过程中表达一套特异的基因，其产物不仅决定细胞的形态结构，而且执行各自的生理功能。分化细胞所表达的基因，一类是管家基因；另一类是组织特异性基因。每种类型的细胞分化是由多种调控蛋白共同调控完成的，通过组合调控的方式启动组织特异性基因的表达是细胞分化的基本机制。多细胞有机体在其分化程序与调节机制方面比单细胞生物显得更为复杂，涉及诸多方面，胞外信号分子对细胞分化的影响；细胞记忆与决定；受精卵细胞质的不均一性对细胞分化的影响；细胞间的相互作用与位置效应；环境对性别决定的影响等。

细胞癌变是细胞分化领域的一个特殊问题，因为肿瘤细胞可以看做是正常细胞分化机制失控的细胞，成为"不死"的永生细胞。癌细胞与正常分化细胞不同的是，不同类型的分化细胞都具有相同的基因组；而癌细胞的基因组却发生不同形式的突变。此外癌细胞还具有许多其他特征。

癌基因是控制细胞生长和分裂的正常基因(又称原癌基因)的一种突变形式，能引起正常细胞癌变。癌基因编码的蛋白主要包括生长因子、生长因子受体、信号转导通路中的分子、基因转录调节因子和细胞周期调控蛋白等几大类型。抑癌基因实际上是正常细胞增殖过程中的负调控因子，它编码的蛋白往往在细胞周期的检验点上起阻止周期进程的作用。如果抑癌基因突变，丧失其细胞增殖的负调控作用，则导致细胞失控而过度增殖。癌症是一种典型的老年性疾病，它涉及一系列的原癌基因与肿瘤抑制基因的致癌突变的积累。

真核细胞基因表达的调控是多级调控系统，主要发生在三个彼此相对独立的水平上：转录水平的调控，决定某个基因是否会被转录，并决定转录的频率。真核细胞在特定时间通过差别基因转录选择性地合成蛋白质，转录水平的调控包括转录的激活和转录的阻抑，既与顺式调控元件有关，又与反式作用因子有关；加工水平的调控，决定初始 mRNA 转录物(hn RNA)被加工为能翻译成多肽的信使 RNA(mRNA)的途径，选择性剪接是一种广泛存在的 RNA 加工机制，通过这种方式，一个基因能编码两个或多个相关的蛋白质，产生蛋白质多样性，这是在 RNA 加工水平上调节基因表达的重要方式；翻译水平的调控，决定某种 mRNA 是否会真正得到翻译，如果能得到翻译，还决定翻译的频率和时间长短。翻译水平的调控机制，一般都是通过细胞质中特异的 mRNA 和多种蛋白质之间的相互作用来实现的。涉及到 mRNA 的细胞质定位，mRNA 翻译的调控和 mRNA 稳定性的调控等。

思考题

1. 何谓细胞分化？为什么说细胞分化是基因选择性表达的结果？
2. 组织特异性基因的表达是如何调控的？
3. 影响细胞分化的因素有哪些？请予说明。
4. 说明癌症的发生与癌基因和抑癌基因的关系。
5. 为什么说肿瘤的发生是基因突变逐渐积累的结果？
6. 如何理解真核细胞基因表达调控的复杂性？
7. 真核细胞基因表达调控有哪些不同环节，各有何作用？

参考文献

1. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: concepts and experiments. 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. ,1999

2. Bruce Alberts, *et al*. Molecular Biology of the Cell, 3rd Edition. New York & London: Garland Publishing, Inc. ,1994

3. Bruce Alberts, *et al*. Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. New York & London: Gar land Publishing, Inc. ,1998

4. Benjamin Lewin. Genes Ⅵ. New York: Oxford University Press, Inc. ,1997

5. Douglass J Forbes and Alexander D Johnson. Current Opinion in Cell Biology: Nucleus and gene expression. 1995,7(3)

6. Miller W A 著. 黄秀英，劳为德，郑瑞珍等译. 发育生物学. 北京：高等教育出版社，施普林格出版社，1998

7. Christopher R R, Bjornson, *et al*. Turning Brain into Blood: A Hemotopoietic fate adopted by Adult Neural Stem Cell in Vivo. Science, 1999(283): 534～537

8. Scott F, Gilbert. Developmental Biology. Sinauer Associates. Inc. ,1994

第十三章

细胞衰老与凋亡

第一节　细胞衰老

一、早期的细胞衰老研究

关于细胞衰老(cellular aging 或 cell senescence)的研究,在衰老生物学中占有特殊的地位。大量研究表明,衰老实际上也是一种细胞的重要生命活动。然而对这一问题的认识过程却是漫长而曲折的。

大约在 100 年前,当魏斯曼提出种质不死而体质会衰老和死亡的学说时,他是将单细胞生物,特别是原生动物排除在外的。确实,当时观察到原生动物的某些无性系可以长期保持很高的分裂速度,因此关于原生动物不死的说法曾经广为流行。但以后的研究却发现原生动物的细胞分裂不是均等的,新细胞的结构成分并不是完全更新的,新细胞中也存在着老化的结构成分;少数强壮的无性系的存在并不能否定原生动物细胞衰老的事实。因此关于原生动物细胞"不死性"的说法就逐渐被废弃了,代之而起的是关于某些无性系的稳定性的观点。

然而,当 Carrel 和 Ebeling 宣布他们培养的鸡心脏细胞可以无限制地生长和分裂(直到他们报告时,已连续培养了 34 年)时,细胞"不死性"的观点不但卷土重来,而且几乎取得了决定性的胜利。后来他们还报告说,鸡胚成纤维细胞在离体培养条件下的生长速度与培养基中加入的鸡血浆供体年龄呈负相关,似乎表明年老动物的血浆中存在有衰老因子。他们认为细胞本身不会衰老,衰老是由于环境的影响。20 世纪 40—50 年代 L 系小鼠细胞和 HeLa 细胞系的建立,又使细胞"不死性"的观点的统治地位更加巩固了。根据这种观点,细胞本身没有衰老和死亡,衰老只是一种多细胞现象,多细胞生物体内观察到的细胞衰老,起因不在细胞本身,而是由于体内、体外环境的影响。这种观点在 60 年代初,主要由于 Hayflick 等人的工作而受到猛烈的冲击,并从根本上动摇了。

二、Hayflick 界限

1961 年，Hayflick 和 Moorhead 报告说，培养的人二倍体细胞表现出明显的衰老、退化和死亡的过程。若以 1:2 的比率连续进行传代（群体倍增），则平均只能传代 40～60 次，此后细胞就逐渐解体并死亡。Hayflick 等的发现很快就得到许多研究者的证实。他们的工作表明，细胞，至少是培养的细胞，不是不死的，而是有一定的寿命；它们的增殖能力不是无限的，而是有一定的界限，这就是有名的 Hayflick 界限（Hayflick Limitation）。Hayflick 等的工作是对 Carrel 等人坚持的关于细胞"不死性"的学说的彻底否定。此外，运用现代的培养技术并不能重复出 Carrel 所观察到的培养细胞无限生长的现象。Hayflick 认为 Carrel 每次向培养基中加入的鸡胚提取物可能混杂人了新鲜的细胞。而不死的 HeLa 细胞和 L 系小鼠细胞已被证明是不正常的细胞，它们的染色体数目或形态已经不同于原先的细胞了。此外，Hayflick 等还发现，从胎儿肺得到的成纤维细胞可在体外条件下传代 50 次，而从成人肺得到的成纤维细胞只能传代 20 次，可见细胞的增殖能力与供体年龄有关。这一现象也为许多研究者所证实。Goldstein 选用了早老症（Hayflick-Guilford 综合症）及 Werner 氏综合症患者的成纤维细胞进行培养。这两种病的患者表现出极其明显的衰老特征，例如 9 岁的早老症患者组织中已经有老年色素的沉积，外貌看起来就像 70 多岁的人那样老，通常在 20 岁前死去。从这种病人身上得到的成纤维细胞在体外只能传代 2～4 次，其 DNA 合成亦较少，且细胞表面不具有正常成纤维细胞所具有的 HLA 抗原标记。Werner 氏综合症患者的成纤维细胞在体外培养条件下的行为亦大体相同。这些研究有力地说明，体外培养的二倍体细胞的增殖能力反映了它们在体内的衰老状况。Hayflick 还比较了取自寿命长度不同的生物的胚成纤维细胞在体外培养条件下的传代数和寿命，发现物种寿命与培养细胞寿命之间存在着确定的相关关系，例如 Galapagos 龟平均最高寿命最长，达 175 岁，其培养细胞的传代数亦最多，达 90～125 次；小鼠平均最高寿命为 3.5 年，其培养细胞的传代次数亦少，仅 14～28 次。

为了确定培养的人二倍体细胞的衰老是细胞本身决定的还是由于培养环境的恶化（例如培养基中营养物质的缺乏，细菌的污染或有毒物质的积累），Hayflick 设计了巧妙的实验：他以间期有无巴氏小体作为供体细胞的标记，将取自老年男性个体的细胞（间期无巴氏小体）和取自年轻女性个体的细胞（间期可见巴氏小体）进行单独或混合培养，并统计其倍增次数；结果发现，混合培养中的两类细胞的倍增次数与各自单独培养时相同，即在同一培养基中，当年轻细胞旺盛增殖的同时，年老细胞就停止生长了。这一结果有力地说明，决定细胞衰老的因素在细胞内部，而不在外部环境。为了进一步探求体外培养的二倍体细胞衰老表达的控制机理，Wright 和 Hayflick 用细胞松弛素 B 处理细胞，然后离心以除去细胞核，得到胞质体（cytoplast），再用胞质体与完整细胞进行杂交，观察杂

种细胞衰老的表达。结果发现，年轻的细胞胞质体与年老的完整细胞融合时，得到的杂种细胞不能分裂；而年老的细胞胞质体与年轻的完整细胞融合时，杂种细胞的分裂能力与年轻细胞几乎相同。这一实验的结果说明，是细胞核而不是细胞质决定了细胞衰老的表达。至此，Hayflick 界限，即关于细胞的增殖能力和寿命是有限的观点，为广大的研究者所接受，认为适用于很多类型的细胞；对于这些细胞来说，衰老是不可避免的，衰老的原因在于细胞本身。

三、细胞在体内条件下的衰老

实际上，在生活有机体内，细胞的衰老和死亡是常见的现象，甚至在个体发育的早期也会发生。例如蝌蚪发育时尾和鳃的消失就是通过细胞的死亡而实现的。但体内细胞类型不同，其增殖状况各异。神经元及心肌细胞在发育的早期即已停止分裂，成为固定的有丝分裂后细胞，尔后它们逐渐衰老和死亡。人脑在衰老时神经元的不断丧失即是一个明证。肝细胞、软骨细胞属于可复性分裂后细胞，它们通常不分裂，但终身保持分裂能力，例如部分切除肝细胞后，剩余的肝细胞即能进行旺盛的同步分裂。引起人们最大兴趣的要算那些在正常情况下终生保持分裂的细胞，如骨髓细胞，上皮细胞等。它们的分裂能力是否随着有机体年龄的增高而下降？它们会不会衰老？这些问题引起了研究者们极大的兴趣。

以往曾有人研究过不同年龄 BCF_1 小鼠小肠腺窝上皮细胞的周期长度，发现随着年龄的增高，细胞周期长度明显延长。2 月龄小鼠细胞周期总长度为 10.1 h，而 27 月龄者竟达 15.2 h，延长 50%。可见衰老动物体内，细胞分裂速度显著减慢，其原因主要是 G_1 期明显延长，S 期的长度变化不大。其他研究者的工作亦得到大体相同的结论。然而细胞周期的延长，亦即细胞分裂能力的下降的原因是什么？是由于细胞本身的衰老，还是由于体内环境的恶化？为了解答这个问题，研究者们采用了组织移植技术。Krohn 用近交系小鼠进行皮肤移植实验。他将小鼠的皮肤移植到其 F_1 后代身上，当 F_1 变老时，又移植到 F_2 身上，这样他进行了系列移植，结果移植的皮肤细胞可生活 7～8 年，远远超过其原来供体的寿命，这表明引起小鼠皮肤细胞在体内衰老的主要是体内环境。Daniel 用小鼠乳腺上皮进行了系列移植实验，如果两次移植的间隔时间为 1 年，则可存活 6 年，也明显长于小鼠的寿命，说明衰老个体内的环境因素影响了上皮细胞的增殖和衰老。

研究得最为充分的要算骨髓干细胞的移植。骨髓干细胞产生淋巴细胞、红血细胞、粒细胞及血小板的前体细胞。Hirokawa 等将老年动物进行强辐射处理，破坏其免疫干细胞，然后移植入年轻动物的骨髓和新生小鼠的胸腺，结果观察到年老受体动物细胞免疫功能复壮。这似乎表明免疫功能的复壮是由于年轻动物的干细胞取代了原来老化了的干细胞。Astle 和 Hirokawa(1984)重复并证实了 Hirokawa 等的实验，他们还发现，如果移植的骨髓干细胞是来自年老的动物，那么免疫反应就仍然保持在较低的水平上，不会复壮。他们认为免疫反应是

否复壮,关键在于供体与受体的年龄组合。他们的结论是,老年动物干细胞的免疫缺陷只是在老年受体中才表达。进一步的研究表明老年动物体内似乎存在有阻抑细胞或阻抑因子,抑制了免疫反应。

总之,根据以上的研究,虽然不能认为骨髓干细胞没有衰老,但可以说,它们的衰老至少是比较缓慢的。揭示干细胞衰老缓慢的机理,对于了解衰老的本质,无疑是十分重要的。

四、衰老细胞结构的变化

细胞在衰老过程中,其结构会发生深刻的变化。

(一) 细胞核的变化

在体外培养的二倍体细胞中发现,细胞核的大小是倍增次数的函数,即随着细胞分裂次数的增加,核不断增大。

细胞核结构的衰老变化中最明显的是核膜的内折(invagination),这在培养的人肺成纤维细胞中比较明显。在体内细胞中也可观察到核膜不同程度的内折,神经细胞尤为明显,这种内折与年龄俱增。核膜内折在老年小鼠的普肯耶细胞、海马、垂体前叶及肝细胞中均可观察到。染色质固缩化是衰老细胞核中的另一个重要变化。体外培养的细胞中,晚代细胞的核里可明显看到染色质的固缩化,而早代细胞的核只有轻微的固缩作用。除了培养细胞外,体内细胞,如老年果蝇的细胞,老年灵长类的垂体细胞及大鼠颌下腺的腺泡细胞中,都可观察到染色质的固缩化。染色质固缩作用与染色质蛋白的二硫键有关。此外,在酵母Sgsl突变体衰老细胞中还观察到核仁裂解为小体的现象。

(二) 内质网的变化

Hasan 和 Glees 比较了不同年龄大鼠海马细胞的内质网结构,发现年轻动物的细胞中,糙面内质网发育良好,排列有序;而在年老动物中,这种有序的排列已不复存在,内质网成分弥散性地分散于核周胞质中。在衰老大鼠的侧前庭核及小脑普肯耶细胞中,均观察到糙面内质网解体的趋势。在光学显微镜下用碱性染料染色,可以观察到小鼠和人的大脑及小脑某些神经元中尼氏物质的含量随年龄增长而下降,而尼氏小体实际上代表了内质网和核糖体群。观察体外培养的人胚肺成纤维细胞,发现26次倍增以前的细胞内质网膜腔膨胀扩大,含有不定形的致密物质,且为核糖体所覆盖;而40次倍增以后的细胞内质网膜腔未见膨胀,所含不定形致密物质亦少,且具无核糖体覆盖区段。总的说来,衰老细胞中糙面内质网的总量似乎是减少了。

(三) 线粒体的变化

多数研究者的工作表明,细胞中线粒体的数量随年龄增大而减少,而其体积则随年龄增大而增大。例如在衰老小鼠的神经肌肉连接的前突触终末中可以观察到线粒体数量随年龄增大而减少。同时许多报告表明,在小鼠、大鼠及人肝的衰老细胞中,线粒体发生膨大。膨大的线粒体中有时可见到清晰的嵴,偶尔亦会

观察到线粒体内容物呈现网状化并形成多囊体，以及外膜破坏，多囊体释出的情况。

在培养的人成纤维细胞中，还观察到两种不同类型的线粒体：Ⅰ型固缩紧密，Ⅱ型大而稀疏，通常每个细胞只含一种类型的线粒体；随着倍增次数的增加，Ⅰ型线粒体越来越多。

（四）致密体的生成

致密体（dense bodies）是衰老细胞中常见的一种结构，绝大多数动物细胞在衰老时都会有致密体的积累。除了致密体外，这种细胞成分还有许多不同的名称，如脂褐质（lipofuscin）、老年色素（age or senile pigment）、血褐质（hemofuscin）、脂色素（lipochrome）、黄色素（yellowpigment）、透明蜡体（hyaloceroid）及残体（residual bodies）等等。致密体的发现可上溯至 19 世纪，但只是近年来才逐渐弄清了它们的起源。较近的研究提供了大量证据，表明致密体是由溶酶体或线粒体转化而来。多数致密体具单层膜且有阳性的磷酸酶反应，这和溶酶体是一致的。少数致密体显然是由线粒体转化而来，因为可以看到双层膜结构，有时嵴的结构也依稀可见。脂褐质通常产生自发荧光，它是自由基诱发的脂质过氧化作用的产物。

（五）膜系统的变化

年轻的功能健全的细胞的膜相是典型的液晶相，这种膜的脂双层比较柔韧，脂肪酸链能自由移动，每个脂质分子与其相邻分子之间的位置交换极其频繁，埋藏于其中的蛋白质分子表现出最大的生物学活性。衰老的或有缺陷的膜通常处于凝胶相或固相，这时磷脂的脂肪酸尾被“冻结”了，完全不能自由移动，而膜就变为刚性的了，因此埋藏于其中的蛋白质也就不能再运动了；在机械刺激或压迫等条件下，膜就会出现裂隙，其选择透性及其他功能均受到损害。

此外，细胞衰老时，细胞间间隙连接及膜内颗粒的分布也发生变化。间隙连接在细胞间离子和小分子代谢物的交换上起着重要的作用。研究发现，培养的 IMR－90 晚代细胞的间隙连接明显减少，组成间隙连接的膜内颗粒聚集体变小。为了观察间隙连接的变化对细胞间的代谢联系产生的影响，研究者们还用放射自显影技术来研究重建间隙连接的年轻或年老细胞间^{3}H－脲嘧啶核苷酸的交换。结果发现，重新集聚 4 h 后，70％的年轻细胞从共同培养的年轻供体细胞得到^{3}H－脲嘧啶，而只有 30％的年老细胞从共同培养的年老供体细胞中得到了这种物质。这表明，衰老时间隙连接的减少，使细胞间代谢协作减少了。

用冷冻断裂法可以看到细胞膜 P 面的膜内颗粒在年老细胞中明显减少，而 E 面颗粒相对增加，但总颗粒数的变化不显著。这种变化反映了衰老细胞中膜内颗粒在膜平面上进行侧向运动能力的丧失。

五、细胞衰老的分子机制

20 世纪 90 年代以来，关于细胞衰老的分子机制的研究有了重大进展，最突

出的成果有:① 单基因的突变导致寿命的显著延长,对这些基因的克隆及其产物特性和功能的研究,使我们对细胞衰老的分子机制的认识大大加深了;② 端粒和端粒酶与细胞衰老关系的发现,提供了控制细胞衰老的新途径,除此以外,在其他一些有关衰老机制的研究上,也取得了不同程度的进展。

(一) 氧化性损伤学说的发展

早在20世纪50年代,Harman就已提出衰老的自由基理论,以后又不断有所发展。这一理论认为,代谢过程中产生的活性氧基团或分子(reactive oxygen species,ROS)引发的氧化性损伤的积累,最终导致衰老。细胞从外界吸收的氧中约有2%~3%变成了ROS,ROS主要有三种类型:① $\cdot O_2$,即超氧自由基;② $\cdot OH$,即羟自由基;③ H_2O_2。它们的高度活性,引发脂质、蛋白质和核酸分子的氧化性损伤,从而导致细胞结构的损伤乃至破坏。例如ROS可以氧化不饱和脂肪酸,并产生过氧化脂质,后者进一步分解,产生小分子醛类物质,进而引起蛋白质等大分子的交联。根据衰老的自由基理论,清除ROS,就可以延长寿命。事实也确实如此。近年来发现,超表达Cu/Zn SOD和过氧化氢酶的转基因果蝇寿命比野生型长34%;而将人SOD1的基因转入成年果蝇的运动神经元中,使果蝇寿命延长40%。差不多同时,有人在线虫中发现了一个*age 1*突变体,其寿命为野生型的两倍,且其SOD及过氧化氢酶活性及对ROS的抵抗力均比野生型高。那末,*age 1*和SOD的基因有什么关系?它们是否是同一个基因呢?研究者克隆了线虫SOD的基因,发现其位置在*tra 2*和*unc lo 4*两个位点之间,这和当时推定的*age 1*基因的位置重叠,从而燃起了人们的希望。如果这二者是同一基因,那末*age 1*突变体的长寿应归因于SOD的抗氧化功能了。然而,很快就发现,这两个基因在位置上有一定的距离,从而否定了当初的猜想。现在我们知道,*age 1*基因编码磷脂酰肌醇-3-激酶的p110催化亚基,其产物介导磷脂酰肌醇的信号传递路线,而和抗氧化作用无关。

进一步的研究更使人们对SOD这一类抗氧化因子对衰老的影响提出了疑问,有人将小鼠的谷胱甘肽过氧化物酶基因及*SOD1*、*SOD2*和*SOD3*基因中的一种剔除,并未引起衰老的加速。

除了*age 1*基因外,近年来还在线虫中发现了另一种和寿命的延长有关的基因,即*clk 1*基因。这个基因是酵母中参与CoQ合成的*Cat5*基因的同类物。确实线虫的*clk 1*突变体中CoQ含量也较低。CoQ是线粒体呼吸链的成员,CoQ的缺乏,使电子传递减慢,ROS的形成减少,代谢变慢,这可能是*clk 1*突变体寿命较长的原因。

(二) 端粒与衰老

端粒(telomere)是染色体末端的一种特殊结构,其DNA由简单的串联重复序列组成。它们在细胞分裂过程中不能为DNA聚合酶完全复制,因而随着细胞分裂的不断进行而逐渐变短,除非有端粒酶(telomerase)的存在。端粒酶是一种核糖核蛋白酶,由RNA和蛋白质组成。端粒酶RNA是合成端粒DNA的模板,而端粒酶的反转录酶亚基(在人细胞中为hTRT)则催化端粒DNA的合成。

合成的端粒重复序列加在染色体的末端。人的染色体端粒由 TTAGGG/CCCTAA重复序列组成。在生殖细胞中，由于存在端粒酶的活性，端粒保持约 15 kb的长度，而在人的体细胞中，由于不存在端粒酶的活性，端粒要短得多。

1990 年 Harley 等人用人工合成的$(TTAGGG)_3$ 作为探针，对胎儿、新生儿、青年人及老年人的成纤维细胞的端粒长度进行测定，发现端粒长度随年龄增长下降。在体外培养的成纤维细胞中，端粒长度则随着分裂次数的增加而下降。在这些研究的基础上，提出了细胞衰老的“有丝分裂钟”学说，该学说认为，随着细胞的每次分裂，端粒不断缩短；当端粒长度缩短达到一个阈值时，细胞就进入衰老。到了 1998 年，Wright 等人提出了更加令人信服的证据。他们将人的端粒酶反转录酶亚基(hTRT)基因通过转染，引入正常的人二倍体细胞(人视网膜色素上皮细胞和包皮成纤维细胞)，发现表达端粒酶的转染细胞，其端粒长度明显增加，分裂旺盛，作为细胞衰老指标的 β 半乳糖苷酶活性则明显降低，与对照细胞形成极鲜明的反差。此外，表达端粒酶的细胞寿命比正常细胞至少长 20 代，且其核型正常。这一研究提供的证据确实令人信服，说明端粒长度确实与衰老有着密切的关系。

当然也有不少研究报告不支持这一学说。就在同一年(1998 年)，Carman 等报告说，二倍体的叙利亚仓鼠胚细胞在复制分裂的各阶段始终表达端粒酶，其端粒长度亦保持恒定，然而经过 20～30 代分裂后，仍然进入衰老。另外，某些小鼠终生保持较长的端粒，但并未因此而获得较长的寿命；特别是剔除端粒酶基因的小鼠已经获得，但在其前 5 代中，迄今未观察到相应的表型的变化(如寿命的缩短)。看来，衰老的“端粒钟学说”还需要经受更多的检验。

(三) rDNA 与衰老

这方面的研究主要是在 *S. cerevisiae* 中进行的。这种酵母的细胞分裂是不对称的，每次分裂，产生一个大的母细胞和一个小的子细胞，母细胞分裂若干代后就进入衰老。经过大量的研究，已经确定细胞衰老的步伐是由 rDNA 的变化所决定的。*S. cereuisiae* 中，rDNA 以 100～200 份串联拷贝的形式存在于第 12 号染色体上，在酵母达到生命的“中年”时的某一时刻，通过同源重组产生的第一份环状 rDNA 片段会膨冲而出，成为染色体外 rDNA 环(extrachromosomal rDNA circle，ERC)。随着细胞分裂的不断进行，ERC 不断复制增加。当积累到 500～1 000份拷贝时，细胞就进入衰老(图 13-1)。用双向电泳法也证明，年老的细胞中积累了许多密闭的环状 rDNA，而年轻细胞中则以线性的基因组 DNA 为主，只含有极少量的环状 rDNA。ERC 的积累，导致细胞衰老，并伴随着核仁的裂解。

ERC 积累引起细胞衰老的机制是在酵母中发现的，一般认为它适用于哺乳类中由分裂细胞组成的组织。但关于哺乳类动物细胞中环状 DNA 随年龄积累的报导并不多见，而且已知的环状 DNA 不包括 rDNA。这方面还需要进一步的研究。

（四）沉默信息调节蛋白复合物与衰老

沉默信息调节蛋白复合物（silencing information regulator complex，Sir Complex），简称 Sir 复合物，包括 Sir1、Sir2、Sir3、Sir4，通常存在于异染色质中。它们一方面与 RAP1 和组蛋白 H3/H4 结合，一方面附在核基质上。Sir 复合物的功能是阻止它们所在位点的 DNA 的转录。在酵母中，Sir 复合物通常存在于端粒及与性别决定有关的 HML 和 HMR 位点上。

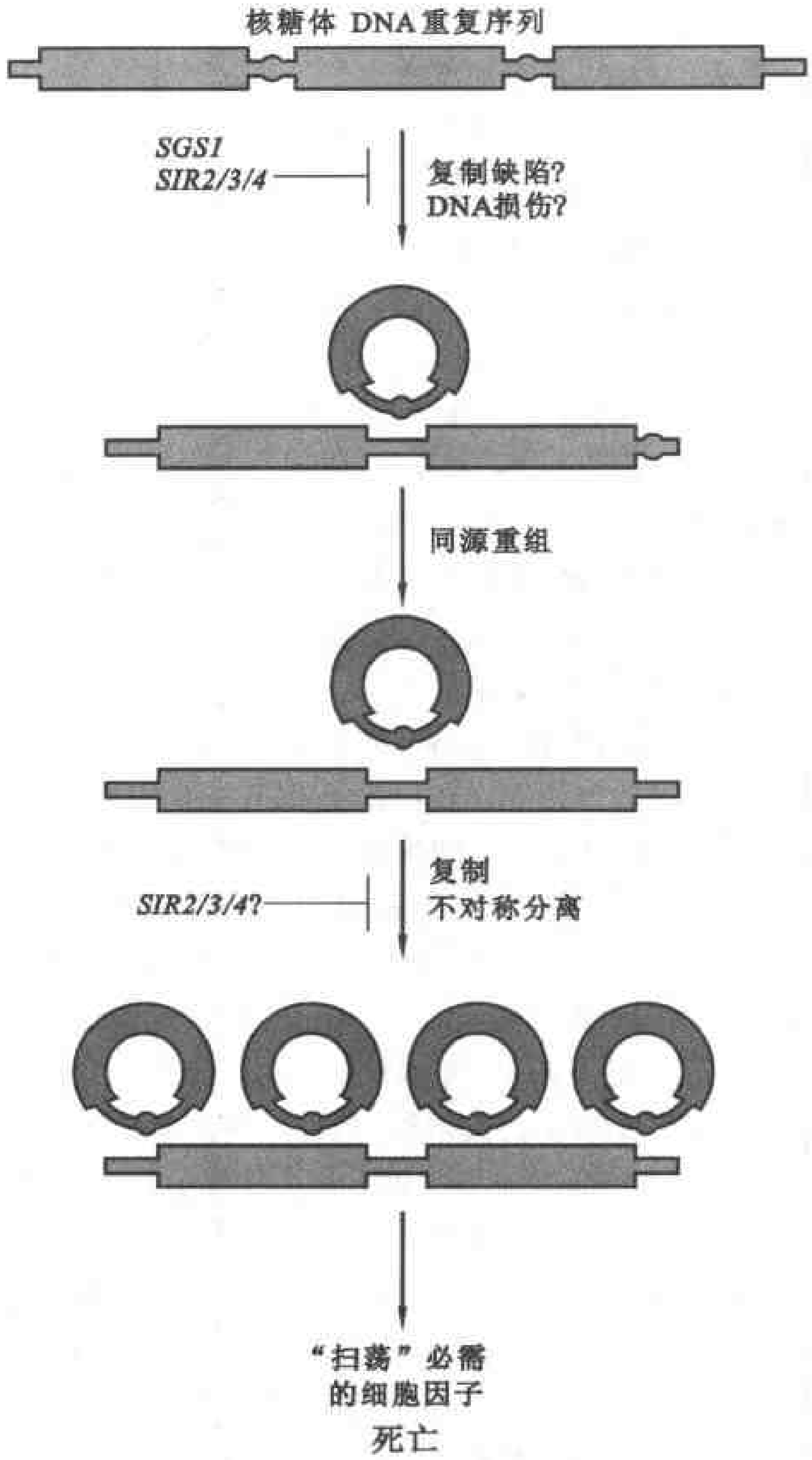


图 13－1 酵母中 ERC 生成示意图

酵母 rDNA 由多份重复序列组成，同源重组往往发生在相邻重复序列的某一 DNA 损伤点上；*SGS1* 基因和 *SIR* 基因减缓 ERC 积累的速率

1994 年 Kennedy 等发现，在一种被称为 SIR4－42 的酵母突变体中，Sir3 蛋白和 Sir4 蛋白发生重新分布的现象，即由端粒等处向核仁转移，这种转移伴随着寿命的延长。这一研究表明，核仁的沉默化与寿命的延长有关。他们发现，从这个突变体中得到的 Sir4 蛋白，其羧基末端的 121 个氨基酸残基被除去。这个区域本是 Sir4 蛋白与端粒和 HM 处的 RAP1 蛋白相互作用的结构域。这一区域的去除，使 Sir 复合物得以自由定位，从端粒和 HM 位点转移至核仁，使核仁的 rDNA 处于沉默状态，抑制了复制，同源重组及 ERC 的生成和积累，从而延长了寿命。

（五）*SGS1* 基因、*WRN* 基因与衰老

在酵母中发现了一种 *sgs1* 突变体，其寿命明显短于野生型。野生型平均分裂 24.5 代，最高分裂代数为 40 代；而 *sgs1* 突变体平均分裂 9.5 代，最高分裂代数为 18。这表明 *SGS1* 基因的缺陷或丧失明显影响了寿命。研究者进一步克隆了 *SGS1* 基因并分析它所编码的蛋白，发现它属于 RecQ 亚族的 DNA 解旋酶。

对 *sgs1* 突变细胞的观察，发现其核仁结构在年轻细胞中正常，而在年老细胞中，核仁裂解为小体。应用免疫荧光法发现了 SGS1 蛋白在细胞中的定位。超过 90％的细胞中，SGS1 蛋白集中在核仁。核仁如果缺少 SGS1 蛋白就会裂解。同时，在 *sgs1* 突变细胞衰老时，可观察到 SIR 蛋白向核仁的转移，转移至核仁的 SIR 蛋白有阻止核仁裂解和细胞衰老的作用。当比较正常酵母（SGS1/SIR3）和（*sgs1*/*sir3*）突变体时，发现经 12 次分裂后，前者核仁裂解率为 6％，而后者达 19％，说明 SIR 蛋白向核仁的转移，抑制了核仁的裂解，延长了寿命。

另一方面，近年来人们也以 Werner 综合症（WS）为对象，进行衰老机制的研究。Werner 综合症是一种引发早老的疾病。WS 病人出生后 10 岁前基本正常；10～20 岁时，缺少正常的青春期快速生长过程；20 多岁时，出现双眼白内障、白发、脱发等正常人老年时才会出现的现象；30 多岁时，出现骨质疏松，Ⅱ型糖尿病，动脉粥样硬化，肿瘤等；40 岁以后，心血管病、肿瘤发生频率大大增加。取自 WS 病人的细胞在体外条件下培养，分裂代数比正常人的细胞少得多；其细胞中发生染色体重排，删除突变频率大大增加，所以 *WRN* 基因是保证正常寿命所必需的。*WRN* 基因与 *SGS1* 基因同源。WRN 蛋白含 1 432 个氨基酸残基，具有 7 个 DNA 解旋酶所特有的标志性序列。对 WS 病人的 WRN 蛋白的分析表明，不同病人的 WRN 蛋白发生了不同的突变，影响其正常功能，造成 DNA 复制的严重障碍。用免疫荧光法也证明，正常人的成纤维细胞中，WRN 蛋白位于核仁中，而来自 WS 病人的皮肤成纤维细胞中，观察不到典型的 WRN 蛋白。这些结果表明，编码 DNA 解旋酶的人 *WRN* 基因和酵母 *SGS1* 基因是保证细胞正常生命周期所必需的，如果发生突变，就会引起衰老的提前发生和寿命的缩短。

（六）发育程序与衰老

近年来，用线虫进行的发育程序与衰老关系的研究取得了重要的进展，线虫（*Canorhabaitis elegans*）的幼虫期持续约 4 天，然后达到性成熟并进入成虫期。

成虫期延续数周，随即衰老死亡。当线虫幼虫在发育过程中遇到不良环境（如虫口过密、食物短缺或高温），引起性外激素浓度的变化，结果幼虫就进入一种特殊的称为 dauer 幼虫的阶段，可以延续 6 个月之久。dauer 幼虫全身被以厚的角质层，口紧闭，处于休眠状态。如果环境条件改善，dauer 幼虫又可发育为成虫，经过数周，完成其生活史。线虫的这种特殊的发育模式引起了研究者的强烈兴趣，因为这牵涉到发育方向的决定和寿命的延长。遗传分析表明，存在着两类有关 dauer 幼虫形成（dauer formation）的基因，称为 *daf* 基因。第一类为 *daf2* 和 *age1* 基因，第二类为 *daf16* 基因。*daf2* 编码类胰岛素受体，*age1* 编码磷脂酰肌醇－3－激酶（PI－3－激酶）的 p110 催化亚基，*daf16* 编码一种转录活化剂。野生型线虫若处于正常条件下，*daf2* 和 *age1* 正常表达，DAF－2 受体蛋白及其下游的 PI－3－激酶进行正常的信号传导，决定了正常的成虫发育。在饥饿或虫口过密的条件下，*daf16* 基因表达，转录活化因子 DAF16 的活性明显增强，使线虫朝 dauer 幼虫的方向发育。在某些 *daf2* 或 *age1* 突变体中，*daf2* 或 *age1* 基因部分得到表达。这样，部分活化的 DAF2/AGE1 信号传导导致决定成虫发育和 dauer 幼虫特异的防御机制的同时表达，其结果是完成正常的成虫发育，而又获得寿命的延长（延长 2～4 倍）。这些工作为衰老机制的探索提供了有意义的信息。高等哺乳动物，包括人类的发育程序要远为复杂，要真正揭示衰老的机制需要深入持久的努力。

（七）线粒体 DNA 与衰老

20 世纪 80 年代，Cummings 等人曾经提出，线粒体 DNA 中存在着衰老 DNA（Sen－DNA）。近十年来，这方面未见突破性的进展。线粒体 DNA 的高突变速率引起研究者的重视是毫不奇怪的。近年来，应用 PCR 扩增技术进一步证明，随着年龄的增长，线粒体 DNA 的突变是相当显著的。衰老的骨骼肌细胞中 16.5 kb 的线粒体 DNA 产生了许多随机的各不相同的删除突变。由于线粒体 DNA 参与电子传递链中某些成员的编码，因而线粒体 DNA 的突变可能导致电子传递链不能执行其正常功能。例如某种删除突变引起细胞色素氧化酶的缺失，从而干扰了电子传递。结果引起 ATP 水平和 NAD/NADH 比率的下降，促进了 ROS 的生成，反过来又引起线粒体 DNA 产生更多的突变。

虽然线粒体 DNA 突变的积累对细胞衰老产生一定的影响，然而这可能不是引起衰老的初始原因。近年来的研究发现，线虫的 *age1* 基因的突变引起寿命的延长，同时也明显减缓了线粒体 DNA 丢失突变的积累。这表明线粒体 DNA 的突变可能处于受 *age1* 突变直接影响的其他衰老事件的下游。

总的来说，细胞衰老机制的研究在近十年中确有不少建树，但谜底的真正揭晓，还要走相当长的路。

第二节　细胞凋亡

一、细胞凋亡的概念及其生物学意义

细胞凋亡一词，即 apoptosis(apo-ptosis)，源自古希腊语，意指花瓣或树叶的脱落、凋零。选用这一名词，是强调这一过程是一种自然的生理学过程。细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程。由于细胞凋亡受到严格的由遗传机制决定的程序性调控，所以也常常被称为细胞编程性死亡（programmed cell death, PCD）。PCD 最初是发育生物学中提出的概念，其含义是发育过程中（例如幼虫发育为成虫）发生的某类细胞（例如肌肉细胞）的大量死亡，而这种细胞死亡要求一定的基因表达。

在生物的生长发育过程中，细胞有丝分裂固然是十分重要的事件，但细胞凋亡也是不可或缺的另一个重要方面。细胞凋亡对于多细胞生物个体发育的正常进行，自稳平衡的保持以及抵御外界各种因素的干扰方面都起着非常关键的作用。通过细胞凋亡，有机体得以清除不再需要的细胞，而不引起炎症反应。在发育过程中，幼体器官的缩小和退化如蝌蚪尾的消失等，都是通过细胞凋亡来实现的。在成熟个体的组织中，细胞的自然更新，被病原体感染细胞的清除也是通过 PCD 来完成的。在发育过程中和成熟组织中细胞发生凋亡的数量是惊人的。健康的成人体内，在骨髓和肠中，每小时约有 10 亿个细胞凋亡。脊椎动物的神经系统在发育过程中，约有 50% 的细胞凋亡，通过细胞凋亡来调节神经细胞的数量，使之与需要神经支配的靶细胞的数量相适应。胚胎发育过程中产生了过量的神经细胞，它们竞争靶细胞所分泌的生存因子。只有接受了足够量的生存因子的神经细胞才能存活，其他的细胞则发生凋亡。实际上，发育过程中手和足的成形过程就伴随着细胞的凋亡。胚胎时期，它们呈铲状，以后指或趾之间的细胞凋亡，才逐渐发育为成形的手和足（图 13－2）。淋巴细胞的克隆选择过程中，细胞凋亡更是起着关键的作用。此外，各种杀手免疫细胞对靶细胞的攻击并引起其死亡，也是基于细胞凋亡。另一方面，细胞凋亡的失调包括不恰当的激活或抑制会导致疾病，例如 Alzheimer 氏病、各种肿瘤、艾滋病以及自身免疫病等。

细胞凋亡的现象最早是 Kerr 在 1965 年观察到的。他发现大鼠肝细胞，在局部缺血条件下连续不断地转化为小的圆形的细胞质团，这些细胞质团是由膜包裹的细胞碎片（包括细胞器和染色质）组成。当时他称这种现象为“皱缩型坏死”。但后来，他觉得这一名称并不恰当，因为这些圆形细胞质团是在生理条件下产生的。经过深思熟虑后，他于 1972 年将这一现象重新定名为细胞凋亡。此后，细胞凋亡很快就受到各国科学家的重视，进行了深入的研究，进入 20 世纪 90 年代，有关细胞凋亡的研究更是蓬勃发展，每隔数周就有重要的突破性的报告发表，进展之快，不是一般的生物学领域能够望其项背的。现在我们对细胞凋

亡的机制已经有了比较清晰的了解，当然不少细节仍需进一步阐明；细胞凋亡与疾病关系的研究也已取得长足的进展。有理由相信，细胞凋亡的研究成果，将为人类某些重大疾病的治疗和控制提供有力的武器。

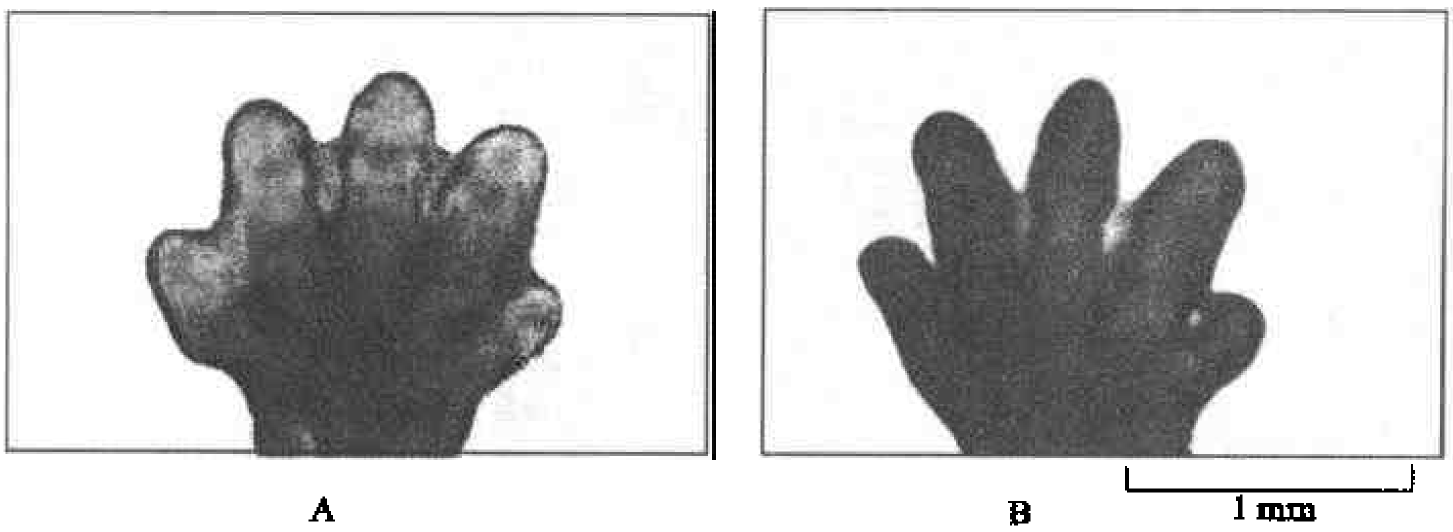


图 13－2 小鼠趾间经特异性染色所观察到的凋亡形态
A：细胞凋亡过程中的小鼠趾；B：一天后的小鼠趾（引自 M.D.Jacobson *et al.*）

二、细胞凋亡的形态学和生物化学特征

（一）细胞凋亡与坏死

细胞凋亡与坏死（necrosis）是两种截然不同的细胞学现象。如前所述，细胞凋亡是一种主动的由基因决定的细胞自我破坏的过程，而坏死则是极端的物理、化学因素或严重的病理性刺激引起的细胞损伤和死亡。二者的主要区别是：细胞凋亡过程中，细胞膜反折，包裹断裂的染色质片段或细胞器，然后逐渐分离，形成众多的凋亡小体（apoptotic bodies），凋亡小体则为邻近的细胞所吞噬，整个过程中，细胞膜的整合性保持良好，死亡细胞的内容物不会逸散到胞外环境中去，因而不引发炎症反应；相反，在细胞坏死时，细胞膜发生渗漏，细胞内容物，包括膨大和破碎的细胞器以及染色质片段，释放到胞外，导致炎症反应（图 13－3）。我们在下面将会讲到，细胞凋亡的机制及其调控是极其复杂的，在长期的进化过程中形成的这种复杂的机制对于维持生物体的正常功能是极其重要的。

（二）细胞凋亡的形态学特征

细胞凋亡的发生过程，在形态学上可分为三个阶段：① 凋亡的起始。这一阶段的形态学变化表现为细胞表面的特化结构如微绒毛的消失，细胞间接触的消失，但细胞膜依然完整，未失去选择透性；细胞质中，线粒体大体完整，但核糖体逐渐从内质网上脱离，内质网囊腔膨胀，并逐渐与质膜融合；染色质固缩，形成新月形帽状结构等形态，沿着核膜分布。这一阶段经历数分钟，然后进入第二阶段；② 凋亡小体的形成。首先，核染色质断裂为大小不等的片段，与某些细胞器如线粒体一起聚集，为反折的细胞膜所包围。从外观上看，细胞表面产生了许多泡状或芽状突起（图 13－4）。以后，逐渐分隔，形成单个的凋亡小体；③ 凋亡小

体逐渐为邻近的细胞所吞噬并消化。从细胞凋亡开始，到凋亡小体的出现才数分钟，而整个细胞凋亡过程可能延续 4～9 h。

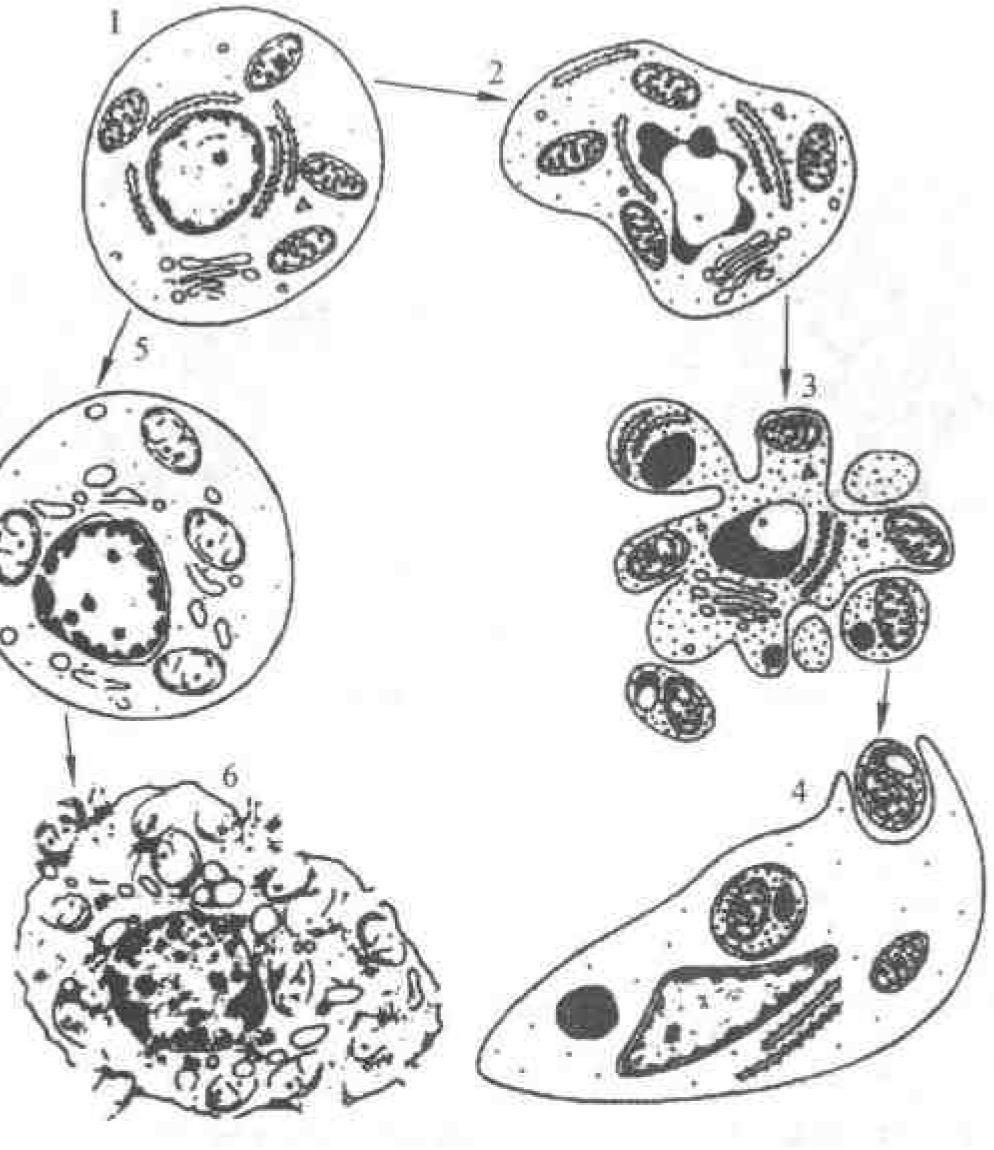


图 13－3　细胞凋亡与坏死的比较

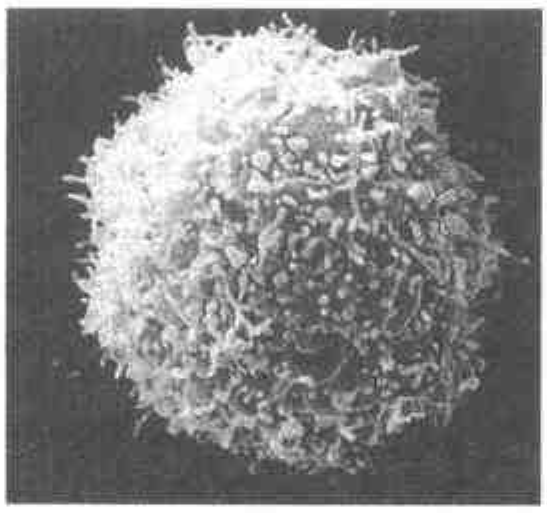
1. 正常细胞；2. 细胞凋亡的起始，染色质固缩、分离并沿核膜分布，细胞质亦发生固缩；3. 凋亡中的细胞，细胞膜反折，包围细胞碎片，如染色质片断和细胞器，形成芽状突起，以后逐渐分隔，形成凋亡小体；4. 凋亡小体被邻近细胞吞噬；5. 坏死的早期阶段，染色体形成串状片段，细胞器膨胀，线粒体基质呈絮状；6. 坏死的最后阶段，细胞膜破裂，细胞解体内容物散逸

(三) 细胞凋亡的生化特征

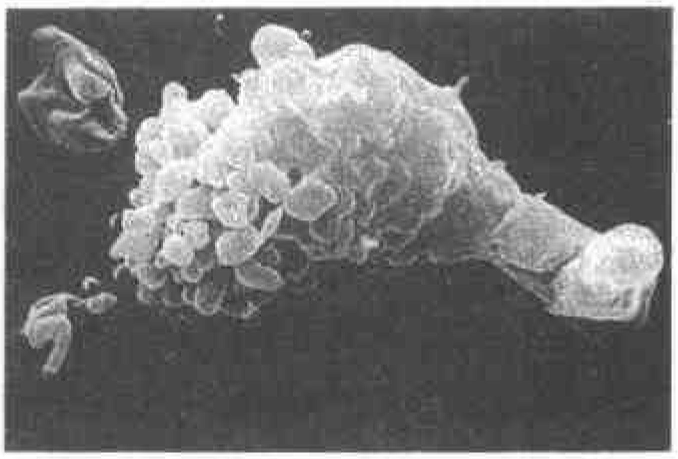
在 caspase 家族半胱氨酸蛋白酶在凋亡中的关键作用(见后)发现以前，人们所认识到的细胞凋亡的最主要特征是 DNA 发生核小体间的断裂，结果产生含有不同数量核小体单位的片段，在进行琼脂糖凝胶电泳时，形成了特征性的梯状条带(DNA ladders)，其大小为 180～200 bp 的整数倍。到目前为止，梯状条带仍然是鉴定细胞凋亡最可靠的方法。催化 DNA 降解的是依赖于 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的核酸内切酶，而 Zn^{2+} 则抑制其活性。

凋亡细胞的另一个重要特征是 tTG(组织转谷氨酰胺酶 tissue transglutaminase)的积累并达到较高的水平。tTG 催化某些蛋白质的翻译后修饰，主要是通过建立谷氨酰胺和赖氨酸之间的交联以及多胺掺入蛋白质而实现的，其结果导致蛋白质聚合。这类蛋白聚合物不溶于水，不为溶酶体的酶所降解，它们进入凋

亡小体，有助于保持凋亡小体暂时的完整性，防止有害物质的逸出。tTG 只在不再分裂的、已完成分化的细胞中处于活性状态。tTG 是依赖于 Ca^{2+} 的酶，在生活的正常细胞中，由于 Ca^{2+} 浓度较低（$<1\mu mol/L$），tTG 的活性很低；当凋亡起始时，Ca^{2+} 浓度上升，从而使 tTG 活化。



A



B



C

图 13－4 正常与凋亡细胞形态比较

A：正常 T 细胞杂交瘤细胞（扫描电镜）；B：凋亡 T 细胞杂交瘤细胞（扫描电镜）；
C：膜出泡抑制剂处理的凋亡细胞（透射电镜）

（四）诱导细胞凋亡的因子

诱导细胞凋亡的因子大致可分为两大类：

（1）物理性因子：包括射线（如紫外线、γ 射线等），较温和的温度刺激（如热激、冷激）等。

（2）化学及生物因子：包括活性氧基团和分子（如超氧自由基、羟自由基、H_2O_2）、钙离子载体、VK_3、视黄酸、细胞毒素（如 fumonisins 和 AAL 毒素）。DNA 和蛋白质合成的抑制剂（如环己亚胺）、正常生理因子（如激素、细胞生长因子等）的失调，肿瘤坏死因子 α（TNFα），抗 Fas/Apo－1/CD95 抗体等。

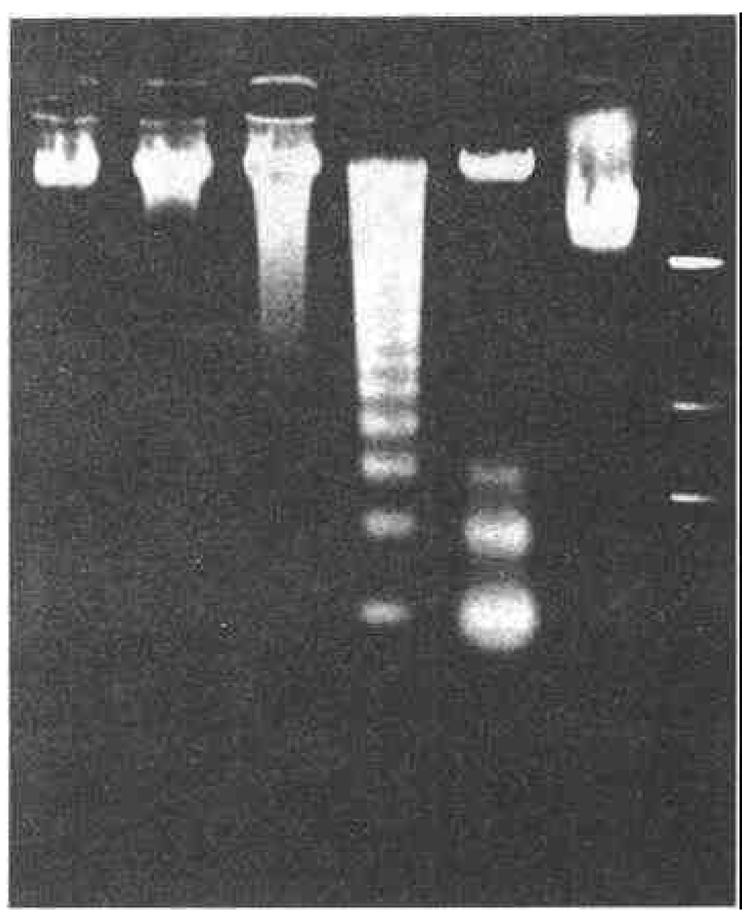
（五）细胞凋亡的检测

细胞凋亡的检测是基于凋亡细胞所形成的形态学和生物化学特征，特别是

DNA 的断裂。

1. 形态学观测

应用各种染色法可观察到凋亡细胞的各种形态学特征，有些染料如台盼蓝



dUTP nick end labeling 的缩写，意指末端脱氧核苷酸移换酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法。这一方法能对 DNA 分子中 3′-OH 断裂缺口进行原位标记。凋亡细胞的核 DNA 中产生的 3′-OH 末端，可借助一种可观测的标记物，如荧光素进行原位标记，并用荧光显微镜进行观察。

4. 彗星电泳法

彗星电泳法(comet assay)的原理是将单个细胞悬浮于琼脂糖凝胶中，经裂解处理后，再在电场中进行短时间的电泳，并用荧光染料染色，凋亡细胞中形成的 DNA 降解片段，在电场中泳动速度较快，使细胞核呈现出一种彗星式的图案；而正常的无 DNA 断裂的核在泳动时保持圆球形，这是一种快速简便的凋亡检测法。

5. 流式细胞分析

最常用来分析细胞凋亡的流式细胞技术是根据凋亡细胞 DNA 断裂和丢失，采用碘化丙锭使 DNA 产生激发荧光，用流式细胞仪检出凋亡的亚二倍体细胞，同时又能观察细胞的周期状态。

三、细胞凋亡的分子机制

(一) caspase 家族与凋亡

1. caspase 家族

caspases 是近年来发现的一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶，它们的一个重要共同点是特异地断开天冬氨酸残基后的肽键。caspase 一词是从 cysteine aspartic acic specific protease 的词头和词尾缩写衍生而来，反映了这个特征，而这种高度的特异性在蛋白酶中是很少见的。

由于这种特异性，使 caspase 能够高度选择性地切割某些蛋白质，这种切割只发生在少数(通常只有 1 个)位点上，主要是在结构域间的位点上，切割的结果或是活化某种蛋白，或是使某种蛋白失活，但从不完全降解一种蛋白质。

caspase 的研究源于线虫(*C. elegans*)细胞程序化死亡的研究。线虫在发育过程中，有 131 个细胞将进入程序化死亡；研究发现有 11 个基因与 PCD 有关，其中 *ced3* 和 *ced4* 基因是决定细胞凋亡所必需的，*ced9* 基因抑制 PCD。线虫细胞程序化死亡的研究促进了其他动物特别是哺乳类动物中细胞凋亡的研究。人们发现哺乳类细胞中存在着 Ced3 的同源物 ICE(interleukin 1β converting enzyme)，它催化白介素 1β 的活化，即从其前体上将 IL 1β 切割下来。在大鼠成纤维细胞中过量表达 ICE 和 Ced3 都会引起细胞凋亡，表明了 ICE 和 Ced3 在结构和功能上的相似性；然而剔除 ICE 的基因的小鼠其表型正常，并未发现细胞凋亡发生明显改变。进一步的研究发现，另一个 ICE 成员，后来被称为 apopain，CPP32 或 Yama 的半胱氨酸蛋白酶，催化 poly(ADP ribose)polymerase(PARP)，即聚(ADP 核糖)聚合酶的裂解，结果导致细胞的凋亡，因而认为 apopain 执行着与线虫中的 Ced3 相同的功能。apopain 被称为是“死亡酶”，而 PARP 被认为是

"死亡底物"。apopain/CPP32/Yama 是在 1995 年由两个实验室分别同时报导，时间上只有两周之差。Ced4 的哺乳类同源物则迟迟未能发现，直到 1997 年，才被证明是 Apaf 1(即一种细胞凋亡蛋白酶活化因子 apoptosis protease activating factor)。而 Ced 9 的哺乳类对应物则较早地被证明是 BCL 2，这一问题将在以后的部分述及。

现已确定至少存在 11 种 caspase(表 13－1)：

表 13－1　caspase 超家族成员及其相应底物

名称及其别名	底物
caspase 1(ICE)	Pro－ILβ；pro-caspase 3，7
caspase 2(Nedd－2/ICH1)	
caspase 3(apopain/CPP32/Yama)	PARP；SREBP；DFF；DNA－PK
caspase 4(Tx/ICH2/ICE$_{rel}$－Ⅱ)	
caspase 5(ICE$_{rel}$－Ⅲ/TY)	
caspase 6(Mch2)	Lamin A；keratin 18
caspase 7(ICE　LAP3/Mch3/CMH－1)	PARP；pro-caspase 6；DFF
caspase 8(FLICE/MACH/Mch5)	
caspase 9(ICE　LAP6/Mch6)	
caspase 10(Mch4/FLICE2)	PARP
caspase 11(ICH3)	

这些 caspases 中，caspase 1 和 caspase 11，以及可能还有 caspase 4 被认为不直接参与凋亡信号的转导，它们主要参与白介素前体的活化；而 caspase 2、caspase 8、caspase 9 和 caspase 10 参与细胞凋亡的起始；参与细胞凋亡执行的则是 caspase 3、caspase 6 和 caspase 7，其中 caspase 3 和 7 具有相近的底物和抑制剂特异性，它们降解 PARP、DFF－45(DNA fragmentation factor 45)，导致 DNA 修复的抑制并启动 DNA 的降解。而 caspase 6 的底物是 lamin A 和 keratin 18，它们的降解导致核纤层和细胞骨架的崩解。

2．caspase 的活化

细胞中合成的 caspase 以无活性的酶原状态存在，以后经活化方能执行其功能。

一般的蛋白酶活化时，只是将 N 端的肽段切除，而 caspase 的活化则需在两个亚基的连接区的天冬氨酸位点进行切割，结果产生了由两个亚基组成的异二聚体，此即具有活性的酶。通常 N 端的肽在活化时也被除去，但对于 caspase 7 是否去除 N 端肽对活性无影响。目前认为细胞凋亡的起始者(caspase 2，8，9 和 10)和执行者(caspase 3，6 和 7)之间存在着上下游关系，即起始者活化执行者。

凋亡起始者(caspase 2，8 和 10)的活化属于同性活化(homo activation)。caspase 8 和 10 含有串联重复的"死亡效应子"结构域(death effector domain，DED)，而 caspase 2 和 9 则含有不同但类似的 caspase 募集结构域(caspase recruitment domain CARD)，这两种结构域是募集 caspase 2，8 和 10 所必需的。

caspase 8 和 10 的活化要求下列成员的参与：

(1) 配体/受体对,如 FasL/Fas,TNF/TNF 受体。

(2) 连接器或接头蛋白 FADD(fas-associated death domain protein)。

(3) 修饰子蛋白:当凋亡信号由 TNF/TNF 受体途径传导时,则要求修饰子蛋白 TRADD(TNF receptor associated death domain protein)的参与。

(4) caspase 2,8 和 10 的酶原。

当 Fas(CD95)或 TNF 受体为其天然配体 FasL 或 TNF 所启动时,就形成了由 Fas 或 TNF 受体、连接器蛋白 FADD 和 caspase 2,8 和 10 的酶原组成的死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex,DISC)。受体蛋白通过直接与连接器蛋白 FADD 作用(有时需要修饰子蛋白的中介)而使 caspase 2,8 及 10 的酶原聚集在其附近,即细胞质表面。当酶原达到一定浓度时,它们就进行同性活化(homo-activation),在大小亚基之间进行切割,产生具有活性的酶。

Caspase 2,8 和 10 活化以后,就通过异性活化(hetero-activation),使下游的 caspase 包括 caspase 3 和 7 活化,使其成为凋亡的执行者。

值得一提的是在活化的细胞毒性 T 淋巴细胞和天然杀手细胞的溶胞颗粒中存在一种称为粒酶(granzyme B)的丝氨酸蛋白酶,它们的分布是极端局限的(只存在于上述细胞中),另一个特点是这种蛋白酶同样具有天冬氨酸特异性,能使具细胞毒性的细胞诱发其靶细胞(如为病毒感染的细胞及发生癌化的细胞)的凋亡,这是哺乳类免疫系统进化过程中的适应现象的绝好例证,使人对自然选择之精妙叹服不已。除此以外,还有一种出现较早的 caspase 活化途径,它与细胞表面死亡受体无关。线虫中的 *ced 9* 基因的功能是抑制细胞凋亡,*ced 9* 蛋白是 BCL 2 细胞死亡调节者家族的成员,它们在执行凋亡的 caspase(如 caspase 3)的上游起作用。1997 年,从人细胞提取物中发现了三种称为凋亡蛋白酶活化因子(apoptosis protease activating factors,Apafs),在加入 dATP 时能使 caspase 3 活化,它们分别被称为 Apaf1,Apaf2 和 Apaf3。有趣的是发现 Apaf2 就是细胞色素 c。在注定要凋亡的细胞中观察到细胞色素 c 由线粒体释放至细胞质中,而 caspase 就存在于细胞质中。Apaf1 是一种相对分子质量为 130×10^3 的蛋白,其分子中存在着显著的 Ced4 同源区,而在其两侧,存在着两个另外的结构域,其 N 端存在着 CARD 结构域,可直接和 caspase 9 酶原结合,而其 C 端有一个由重复序列组成的大的结构域,则参与和细胞色素 c/Apaf-2 的相互作用。

死亡诱导刺激促进了 Apaf 复合物的形成,从而导致 caspase 9 的活化,而定位在线粒体外膜上的 Bcl2 执行着双重功能,一方面阻止细胞色素 c 从线粒体中释放,一方面与 Apaf1 相结合。

这种活化执行凋亡的 caspase 的途径是相当保守的,在线虫中 Ced3 的活化只能通过 Apafs 途径进行,而在哺乳类细胞中,则发展出其他的 caspase 活化途径(图 13-6)。

(二) 天然的 caspase 抑制剂

如前所述,细胞凋亡是生物体用来清除病毒、防止其进一步侵染的一种机制,而病毒也发展出一种对抗机制,来逃避或阻止凋亡的发生,即抑制 caspase 的

活性。痘病毒蛋白 CrmA 和杆病毒蛋白 p35 就是这样的天然的 caspase 抑制剂。CrmA 能有效地抑制 caspase 1 和 8，但对 caspase 3，7 和 9 的抑制作用很弱。p35 则对大多数 caspase 有较强的抑制作用。

然而，在哺乳类细胞中没有发现 p35 的同源物，而 CrmA 的同源物虽然存在，且为数不少，但没有一种能抑制 caspase。目前已知的哺乳类细胞内源的 caspase 抑制剂是编程性细胞死亡抑制因子（inhibitor of apoptosis，IAP）家族，包括人细胞中的 XIAP，cIAP1 和 cIAP2。它们特异地抑制 caspase 3 和 7，而对 caspase 1，8 和 10 无抑制作用，此外还发现 IAP 能抑制 caspase 9 的活化，在与其他蛋白的协同作用下，也能抑制 caspase8 的活化，这个问题下面还将要谈到。

除了利用 CrmA 或 p35 抑制 caspase 从而阻止细胞凋亡外，病毒还发展出其他的凋亡抑制机制。例如，v－FLIPs 是一组受体介导的细胞凋亡的抑制剂，它们被发现于 γ 疱疹病毒中。v－FLIPs 在人细胞中的同源物称为 FLIP，和 v－FLIPs 一样，它也含有两个 DED 结构域，可与 FADD 发生相互作用，从而阻止了 caspase 8 和 10 与连接器蛋白的结合及活化。

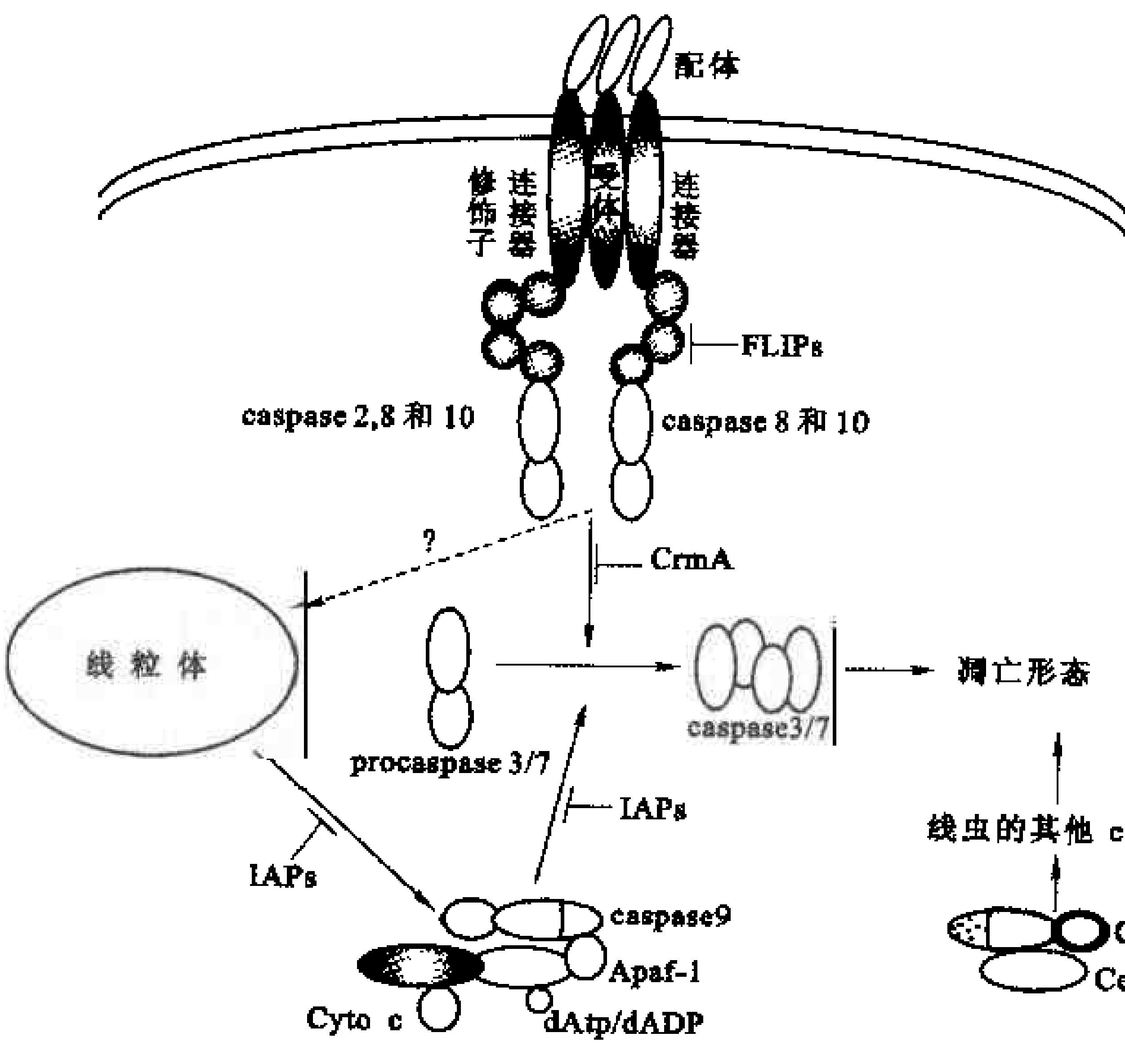


图 13－6　caspase 活化的两条途径

第一条途径：配体/受体连接器蛋白 caspase 8 和 10 活化 caspase 3/7；
第二条途径：通过 Apaf 1/细胞色素 c/caspase 9 而实现 caspase 3/7 的活化

(三) *Bcl2* 家族

Bcl2 是一种原癌基因,是 *ced9* 在哺乳类中的同源物。和一般的癌基因不同,*Bcl2* 能延长细胞的生存,而不是促进细胞的增殖。和 *ced9* 一样,*Bcl2* 能抑制细胞凋亡。

BCL2 可与线粒体及内质网膜相结合。BCL2 蛋白的羧基末端有一穿膜的结构域。若除去穿膜结构域,仍具有一定活性。在胚胎发育过程中,BCL2的表达十分常见,而在成熟组织中,只在那些长期生存的细胞如干细胞以及分裂后的神经元等细胞中才会表达。

近年来发现,实际上存在着一个 *Bcl2* 家族,此家族成员的基因组在不同程度上与已知的 *Bcl 2* 同源,并以不同方式调节细胞凋亡。表 13-2 为 *Bcl2* 家族的主要成员。

表 13-2 *Bcl2* 家族成员

基因产物	功 能
BCL2	凋亡抑制剂,可和 Bax 及 Bak 结合
BCLx	其 L 型抑制凋亡,S 型促进凋亡,与 Bax 及 Bak 结合
BCLw	凋亡抑制剂
BAX	凋亡促进剂,可与 BCL2,$BCLX_L$,E1B19K 结合
BAK	凋亡促进剂,亦可作抑制剂,可与 BCL2,BCLX 和 E1B19K 结合
MCL1	凋亡抑制剂
BAD	凋亡促进剂,与 BCL2 和 $BCLX_L$ 结合
CED9	线虫中的凋亡抑制剂,BCL2 的同源物
E1B19K	腺病毒凋亡抑制剂,与 Bax 和 Bak 结合

Bcl2 家族成员的基因中,常常含有三个保守的 *Bcl2* 同源区,即 *BH1*、*BH2* 和 *BH3*。这三个区域是调节凋亡以及蛋白质相互作用所必需的结构。

(四) p53 与细胞凋亡

p53 是肿瘤抑制基因,其产物主要存在于细胞核内。*p53* 基因是人肿瘤有关基因中突变频率最高的基因。人类肿瘤有 50% 以上是由 *p53* 基因的缺失造成的。如将 *p53* 基因重新导入已转化的细胞中,则可能产生两种不同的结果:① 生长阻遏;② 细胞凋亡。前者是可逆的,后者则不可逆。两种结果的导向取决于生理条件及细胞类型。在皮肤,胸腺及肠上皮细胞中,DNA 的损伤导致 p53 蛋白的积累并伴随着细胞凋亡,说明在这些细胞中,细胞凋亡是依赖于 p53 蛋白的。然而在另一些条件下,p53 蛋白并不是细胞凋亡的必要条件,例如糖皮质激素诱导的胸腺的凋亡就与 p53 蛋白无关。缺少 *p53* 基因的小鼠发育过程基本正常,说明正常发育过程中出现的各种细胞凋亡并不要求 *p53* 的参与。

在依赖于 p53 蛋白的细胞凋亡中,*p53* 基因是通过调节 *Bcl2* 和 *Bax* 基因的表达来影响细胞凋亡的。*p53* 蛋白能特异地抑制 *Bcl2* 的表达,相反对 *Bax* 的表达则有明显的促进作用。研究表明,p53 蛋白是 *Bax* 基因的直接的转录活化因子。在这些细胞中,p53 蛋白的积累和活动引起了细胞凋亡。

(五) 细胞凋亡的信号传导

除了上述的由配体-死亡受体起始或由 Apaf 介导的 caspase 活化并导致细胞凋亡的途径外,还存在着其他与细胞凋亡有关的信号传导途径。

1. Ras-PI3-K-Akt(PKB)抗细胞凋亡途径

我们在前面的章节中已经了解 Ras 蛋白的信号通路在细胞对各种生长因子的反应中起着十分重要的作用。对 Ras-Raf-MAPKK-MAPK 信号通路与细胞凋亡的关系研究得还很不够,虽然有报告表明,Ras 介导的 Raf 通路促进成纤维细胞的凋亡。我们现在主要介绍的是另一类信号通路,即 Ras-PI3-K-Akt (PKB) 抗细胞凋亡途径。PI3-K 是一种重要的细胞信号蛋白,是 Ras 的效应子之一,可为 Ras 所活化。PI3-K 含有一个 p85 的调节亚基和一个 p110 的催化亚基,它催化磷脂酰肌醇 PI(4,5)磷酸化生成 PI(3,4,5)。这一反应的产物能活化 Akt。Akt 又称 PKB,即蛋白磷酸激酶 B,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。最近的研究发现,活化的 Akt 能使 caspase9 酶原磷酸化,使其不能参与 caspase3 的活化。Akt 对 caspase9 酶原的磷酸化是特异性的,磷酸化的位点为 caspase9 大亚基的 196 位丝氨酸。

值得注意的是,活化的 Akt 还能使 Bad 磷酸化,从而使其失去阻断 *Bcl*2 的功能。看来,这也应该包括在 Ras- PI-3K- Akt 的抗细胞凋亡过程之中。

2. NF-kB 与细胞凋亡

NF-kB 是一种调节基因转录的核因子。NF-kB 的活化,引起细胞凋亡的抑制。以往对 NF-kB 抑制细胞凋亡的机理不甚了解。最近的研究发现,NF-kB 的活化能阻止处于 caspase 级联反应顶端的 caspase 8 的活化,从而抑制细胞的凋亡。进一步的研究还发现,NF-kB 的靶基因为 TRAF1(TNFR 结合因子 1),TRAF2,IAP(凋亡抑制剂)蛋白 c-IAP1 和 c-IAP2。这些蛋白的协同作用,抑制了 caspase 8 的活化,从而阻止了下游的 caspases 活化以及细胞的凋亡。研究还发现,Ras 能促进 NF-kB 的活化和相关的抗凋亡蛋白的表达(图13-7)

3. ASK1-SAPK/JNK 及 ASK1-p38 信号途径

不久前发现了一种新的激酶,称为 ASK1(apoptosis signal regulating kinase),在胁迫和细胞因子诱导的细胞凋亡中起着关键的作用。ASK1 是一种哺乳类的 MAPKKK,即 MAP(有丝分裂原活化蛋白 mitogen-activated protein)激酶激酶的激酶。MAP 信号级联系统是一种保守的信号传导途径,由蛋白激酶家族的三类不同成员组成,即 MAP 激酶(MAPK)、MAPK 激酶(MAPKK)、以及 MAPKK 激酶(MAPKKK)。MAPKKK 磷酸化并活化 MAPKK,后者又使 MAPK 磷酸化并活化。活化的 MAPK 转人细胞核中,调节转录因子的活性,从而控制基因的表达。在哺乳类细胞中,通常有两套 MAPK 信号组件在起作用,即 Raf-MAPKK-MAPK 和 MEKK-MKK4-JNK 途径。此外,还存在着另一类 MKK3-p38 (也是一种 MAPK) 信号通路,不过目前对其功能所知甚少。最近的研究发现,ASK1 能选择性地活化 MKK4-JNK 和 MKK3-p38 两种信号通路。在转染 *ASK1* 的 *COS*7 细胞中,*ASK1* 的表达使 MKK4 和 MKK3 的

活性分别升高 7.0 倍和 11.8 倍，JNK 和 p38 的活性分别升高 7.6 倍和 5.0 倍；然而对 MAPKK 则无活化作用。用转染 *ASK1* 基因的貂肺上皮细胞进行的研究发现，*ASK1* 的表达引起典型的细胞凋亡特征的出现，包括细胞质的浓缩、核的凝聚、TUNEL 阳性反应及 DNA 梯状条带的出现。此外还发现，肿瘤坏死因子 TNF－α 能引起细胞凋亡，并活化 JNK 和 p38 信号系统。当用 TNF－α 处理转染 *ASK1* 的貂肺上皮细胞、293 人胚肾细胞、Jurkat T 细胞和 KB 表皮癌细胞时，均观察到 ASK1 的活化。因此，有理由相信，ASK1 通过对 JNK 和 p38 信号通路的活化，可能在凋亡诱导机制中起着重要的作用。

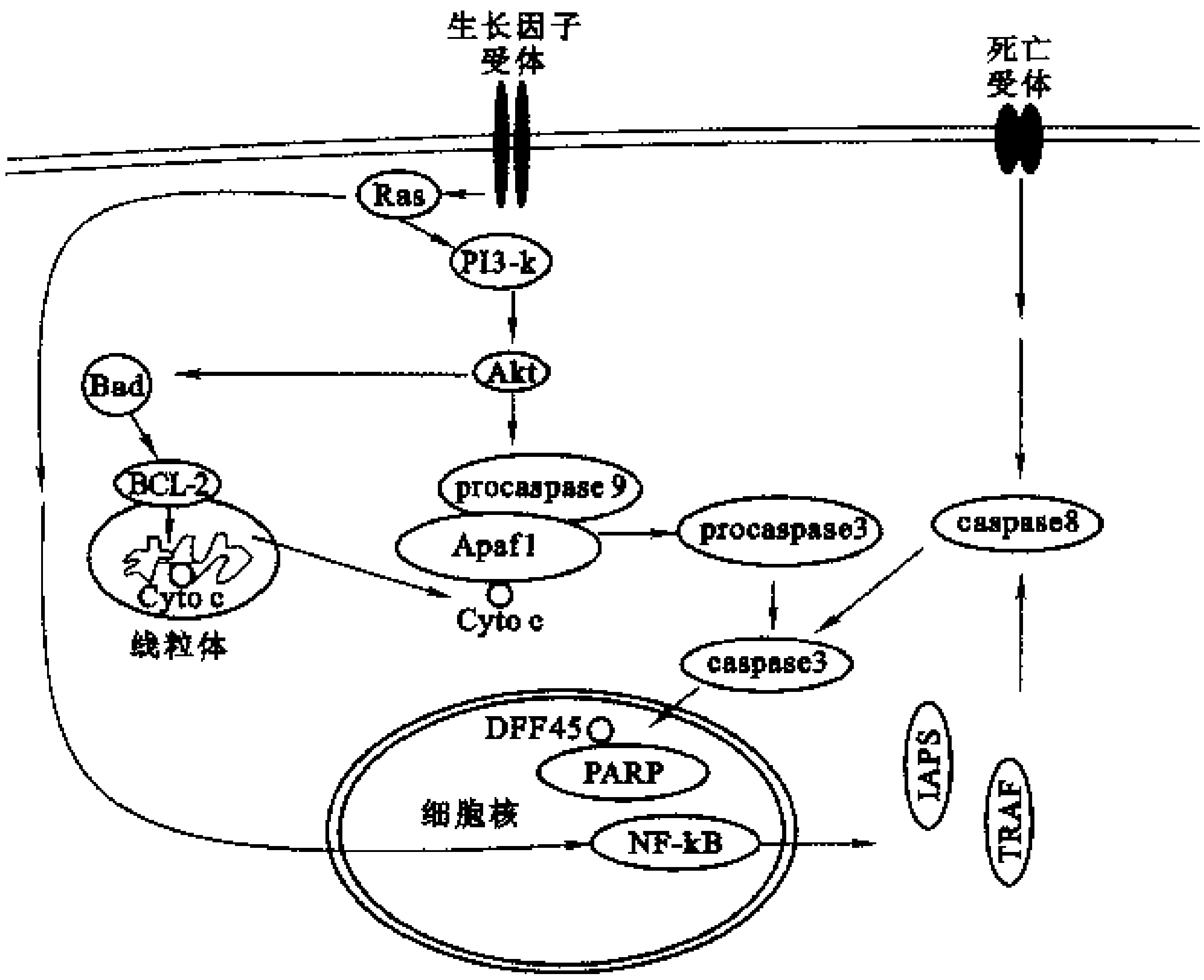


图 13－7 细胞凋亡的信号通路，包括 Akt 和 NF－kB 信号系统

四、植物细胞的凋亡

植物细胞凋亡的研究开始较晚，最早提出植物中存在细胞凋亡的是 1994 年发表的关于拟南芥的过敏反应中出现细胞程序性死亡的报道。以后逐渐有报道证明，细胞凋亡在植物中也广泛存在。与动物一样，细胞凋亡存在于正常的植物发育（如导管的分化、通气组织的形成、糊粉层的退化、绒毡层细胞的死亡、胚胎发育过程中胚柄的退化、单性植物中花器官的程序性退化等）、对环境胁迫的反应（如缺氧、高盐等）和病原体入侵引发的过敏反应中。通常的细胞凋亡检测手段也可以用于植物细胞凋亡的检测，如 DNA 梯状条带、流式细胞术、TUNEL

法、彗星电泳等。一般认为，动植物细胞的凋亡具有共同的或相似的机制。然而目前尚无在植物细胞中克隆分离 caspase 基因的报导，对植物细胞中凋亡途径所知极少。不过采用免疫印迹法和特异的 caspase 四肽底物和抑制剂进行的研究表明，植物细胞凋亡过程中，出现类 caspase 3 和类 caspase 6 的活化，以及聚(ADP-核糖基)聚合酶和类核纤层蛋白的特异性降解。总的来说，植物细胞凋亡的研究尚处于起始阶段。

五、细胞凋亡与衰老

细胞凋亡与衰老的关系是一个相当复杂的问题，两者既有联系又不相同。

有一种颇为流行的观点，认为衰老是由于细胞凋亡的失调引起的。凋亡消除了细胞中误差的积累，从而保证了表型的保真度的维持。凋亡的失调，导致了衰老。事实上，细胞实现凋亡的能力随年龄增长下降，衰老伴随的肿瘤发病率的上升可能是细胞不能实现凋亡引起的，而限制热量(其结果表现为衰老的推迟和寿命的延长)的大鼠，其肝细胞凋亡率比对照组明显上升，而肝癌发生率明显下降。然而，对于某些组织/器官来说，细胞凋亡又往往伴随着衰老，例如男人的心室肌细胞在正常衰老过程中丧失 1/3，大部分是由于坏死，也有相当一部分是由于凋亡；大脑皮层的神经元在衰老时丧失 10%，老年性痴呆病也伴随着神经元的大量丧失。

另一方面，体外培养的成纤维细胞衰老时却不凋亡，因为 BCL2 未受到抑制，在体内就会造成衰老细胞的积累，它们可能产生某些有害的产物。

最后，到目前为止，遗传学的研究不支持细胞凋亡在衰老中的作用，因为对衰老和凋亡的遗传基础已进行了充分的研究，但尚未发现相互重叠的基因。此外，剔除 *Bcl2* 基因的动物，当然会产生细胞凋亡，但并未产生典型的衰老特征，只出现少数表面上与衰老相似的特征。

总之，细胞凋亡与衰老的关系是一个复杂的问题，有待于进一步深入的研究。

提　　要

细胞衰老是一种细胞的重要生命活动现象。然而对细胞衰老的认识却经历了一个曲折而漫长的过程，由早期的细胞“不死性”的观点发展到现今被普遍接受的细胞增殖能力和寿命有限的观点。Hayflick 等人的研究证实：细胞，至少是培养的细胞，不是不死的，而是有一定的寿命；细胞的增殖能力不是无限的，而是有一定的界限，这就是著名的 Hayflick 界限。他们的工作是对细胞“不死性”学说的彻底否定。研究发现，物种寿命与培养细胞之间存在着正相关的关系，即物种寿命愈长，其培养细胞的传代次数愈多，反之，其培养细胞的传代次数愈少。对于在体外培养的二倍体细胞，是细胞核决定细胞的衰老；就细胞内外环境因素

而言，是细胞内部因素决定细胞的衰老。在生活有机体内，细胞的衰老和死亡是常见的生命活动现象。衰老的细胞分裂速度减慢，其原因主要是 G_1 期明显延长，S 期的长度变化不大。

细胞在衰老过程中，其结构发生一系列的深刻变化，包括：细胞核增大，核膜内折，染色质固缩；糙面内质网减少；线粒体变大并且数量减少；产生致密体；膜常处于凝胶相或固相；细胞间间隙连接减少，组成间隙连接的膜内颗粒聚集体变小等。这些形态结构的变化直接导致其相应的功能下降。关于细胞衰老的机制研究近年来取得了重大进展，提出了氧化性损伤学说、有丝分裂钟学说等多种理论，但均未有最终定论。

细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程。它普遍地存在于动物和植物中。由于细胞凋亡在有机体生长发育过程中具有极其重要的意义，对它的研究受到了广泛的关注，并得到迅猛的发展。在细胞凋亡发生过程中，形态结构发生了明显的变化，如细胞表面微绒毛和细胞间接触的消失，内质网囊腔膨胀，染色质固缩，凋亡小体的形成继而逐渐为邻近的细胞所吞噬并消化。整个细胞凋亡过程中内含物不泄露，不引起细胞炎症反应，这是凋亡与坏死的最大区别。DNA 电泳形成的梯状条带是细胞凋亡的典型特征，这是检测细胞凋亡最可靠的一种方法。

诱导细胞凋亡的因子可分为两大类：① 物理性因子；② 化学及生物因子。一般认为，动植物细胞的凋亡具有共同的或相似的机制，已经发现了一些与凋亡有关的基因和酶，但对凋亡的分子机制了解甚少。总之，细胞衰老与凋亡的关系是一个相当复杂的问题，两者既有联系又不相同，在长期的进化过程中形成的这种复杂的机制对于维持生物体的正常功能是极其重要的。

思考题

1. 衰老的特征是什么？
2. 什么是 Hayflick 界限？
3. 细胞凋亡的概念、形态特征及其与坏死的区别是什么？
4. 鉴定细胞凋亡有什么常用方法？
5. 凋亡在有机体生长发育过程中有何重要意义？
6. 凋亡的基本途径是什么？

参考文献

1. FB Johnson, DA Sinclair and L Guarente. Molecular biology of aging. Cell. 96:291～302, 1999

2. DA Sinclair and L Guarente. Extrachromosomal rDNA circles——a cause of aging in yeast. Cell. 91:1033～1042, 1997

3. HR Stennicke and S Salvesen. Properties of the caspases. Biochimica et Biophysica Acta.

1387:17～31,1998

4. H McNeill and J Downward. Apoptosis:Ras to the rescue in the fly eye. Current Biology. 9:R176～R179,1999

5. H Ichijo *et al*. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. Science. 275:90～94, 1997

附录 1

英汉名词索引

A

K

L

M

附录 2

1958—1999 年细胞分子生物学相关领域的诺贝尔奖获奖情况表

年份	获奖人	奖 项	获奖者研究领域
1999	Gunter Blobel	M&P	蛋白质固有的信号控制及其在细胞内的转移与定位
1998	Robert Furchgott Louis Ignarro Ferid Murad	M&P	NO 是体内重要的信号分子
1997	Rolf M. Zinkernagel Peter C. Doherty	M&P	免疫系统对病毒感染细胞的识别
1996	Jens C. Skou Paul Boyer John Walker	Chemistry	Na^+-K^+ ATPase ATP 合成机制
	Stanley B. Prusiner	M&P	蛋白粒子的蛋白结构
1995	Edward B. Lewis Christiane Nusslein – Volhard Eric Wieschaus	M&P	胚胎发育的基因调控
1994	Alfred Giljman Martin Rodbell	M&P	G 蛋白的结构与功能
1993	Richard Roberts Phillip Sharp	M&P	断裂基因和 RNA 合成
1993	Kary Mullis Michael Smith	Chemistry	多聚酶链反应(PCR) 点突变(SDM)
1992	Edmond Fischer	M&P	磷酸化与去磷酸化对酶活性

续表

年份	获奖人	奖　项	获奖者研究领域
	Edwin Krebs		的影响
1991	Erwin Neher	M&P	膜片夹测定膜离子流量
	Bert Sakmann		
1989	J. Michael Bishop	M&P	导致恶性转变的胞内基因
	Harold Varmus		
	Thomas R. Cech	Chemistry	具有催化能力的 RNA
	Sidney Altman		
1988	Johann Deisenhofer	Chemistry	细菌光合作用反应中心
	Robert Huber		
	Hartmut Michel		
1987	Susumu Tonegawa	M&P	基因重排导致抗体的多样性
1986	Rita Levi - Montalcini	M&P	神经生长因子
	Tanley Cohen		
1985	Michael S. Brown	M&P	胆固醇代谢调节与胞吞作用
	Joseph L. Goldstein		的关系
1984	George Kohler	M&P	单克隆抗体
	Cesar Milstein		
	Niels K. Jerne		抗体形成
1983	Barbara McClintock	M&P	基因组中的可动遗传因子
1982	Aaron Klug	Chemistry	核酸蛋白复合物的结构
1980	Paul. Berg	Chemistry	重组 DNA 技术
	Walter Gilbert		DNA 测序技术
	Frederick Sanger		
	Baru Bennnacerraf	M&P	主要组织相容性复合物
	Jean Dausset		
	George D. Snell		
1978	Werner Arber	M&P	限制性内切酶技术
	Daniel Nathans		
	Hamilton Smith		
	Peter Mitchell	Chemistry	氧化磷酸化的化学渗透学说
1976	D. Carleton Gajdusek	M&P	蛋白粒子类疾病

续表

年份	获奖人	奖 项	获奖者研究领域
1975	David Baltimore	M&P	逆转录酶与逆转录病毒活性
	Renato Dulbecco		
	Howard M. Temin		
1974	Albert Claude	M&P	细胞内部组分的结构与功能
	Christian de Duve		
	George E. Palade		
1972	Gerald Edelman	M&P	免疫球蛋白结构
	Rodney R. Porter		
	Christian B. Anfinsen	Chemistry	蛋白质一级结构与四级结构的关系
1971	Earl W. Sutherland	M&P	激素作用机制及其与 cAMP 的关系
1970	Bernard Katz	M&P	神经冲动的扩大及传递
	Ulf S. Von Euler		
	Luis F. Leloir	Chemistry	糖核苷在糖类合成中的作用
1969	Max Delbruck	M&P	病毒的遗传结构
	Alfred D. Hershey		
	Salvador E. Luria		
1968	H. Gobind Khorana	M&P	遗传密码
	Marshall W. Nirenberg		
	Robert W. Holley		tRNA 的结构
1966	Peyton Rous	M&P	致癌病毒
1965	Francois Jacob	M&P	细菌操纵子及其信使 RNA
	Andre M. Lwoff		
	Jacques L. Monod		
1964	Dorothy C. Hodgkin	Chemistry	有机复合物分子的结构
1963	John C. Eccles	M&P	神经膜电位的离子作用机制
	Alan L. Hodgkin		
	Andrew F. Huxley		
1962	Francis H. C. Crick	M&P	DNA 的三维结构
	James D. Watson		
	Maurice H. F. Wilkins		
	John C. Kendrew	Chemistry	球蛋白的三维结构

续表

年份	获奖人	奖　项	获奖者研究领域
	Max F. Perutz		
1961	Melvin Calvin	Chemistry	光合作用中 CO_2 同化作用的生化机制
1960	F. Mac Farlane Burnet Peter B. Medawar	M&P	抗体形成过程中克隆选择理论
1959	Arthur Kornberg Severo Ochoa	M&P	DNA 与 RNA 的合成
1958	George W. Veadle Joshua Lederberg Edward L. Tatum	M&P	基因表达
	Frederick Sanger	Chemistry	蛋白一级结构

注：M&P, Medicine and Physiology Prize(医学和生理奖)